

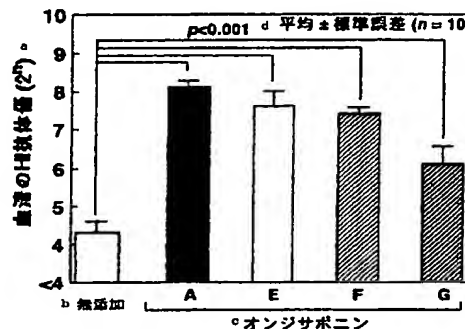
(51) 国際特許分類6 A61K 39/39	A1	(11) 国際公開番号 WO00/15257
		(43) 国際公開日 2000年3月23日 (23.03.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05019		相澤主税(AIZAWA, Chikara)[JP/JP] 鈴木雄次郎(SUZUKI, Yujiro)[JP/JP] 諏佐栄三郎(SUSA, Eizaburo)[JP/JP] 加藤敏夫(KATO, Toshio)[JP/JP] 長峯 隆(NAGAMINE, Takashi)[JP/JP] 〒364-0026 埼玉県北本市荒井六丁目111番地 社団法人 北里研究所 生物製剤研究所内 Saitama, (JP) (74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP) (81) 指定国 AU, BR, CA, CN, IN, JP, KR, MX, RU, US, 欧州 特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書
(22) 国際出願日 1999年9月14日 (14.09.99)		
(30) 優先権データ 特願平10/259783 1998年9月14日 (14.09.98)	JP	
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 社団法人 北里研究所(THE KITASATO INSTITUTE)[JP/JP] 〒108-8642 東京都港区白金5丁目9番1号 Tokyo, (JP)		
(72) 発明者 ; および		
(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 山田陽城(YAMADA, Haruki)[JP/JP] 清原寛章(KIYOHARA, Hiroaki)[JP/JP] 永井隆之(NAGAI, Takayuki)[JP/JP] 矢部武士(YABE, Takeshi)[JP/JP] 〒108-8642 東京都港区白金5丁目9番1号 社団法人 北里研究所 東洋医学総合研究所内 Tokyo, (JP)		

(54) Title: VACCINE PREPARATIONS CONTAINING SAPONINS

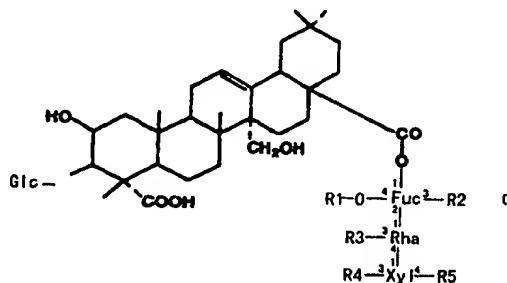
(54) 発明の名称 サポニンを含むワクチン製剤

(57) Abstract

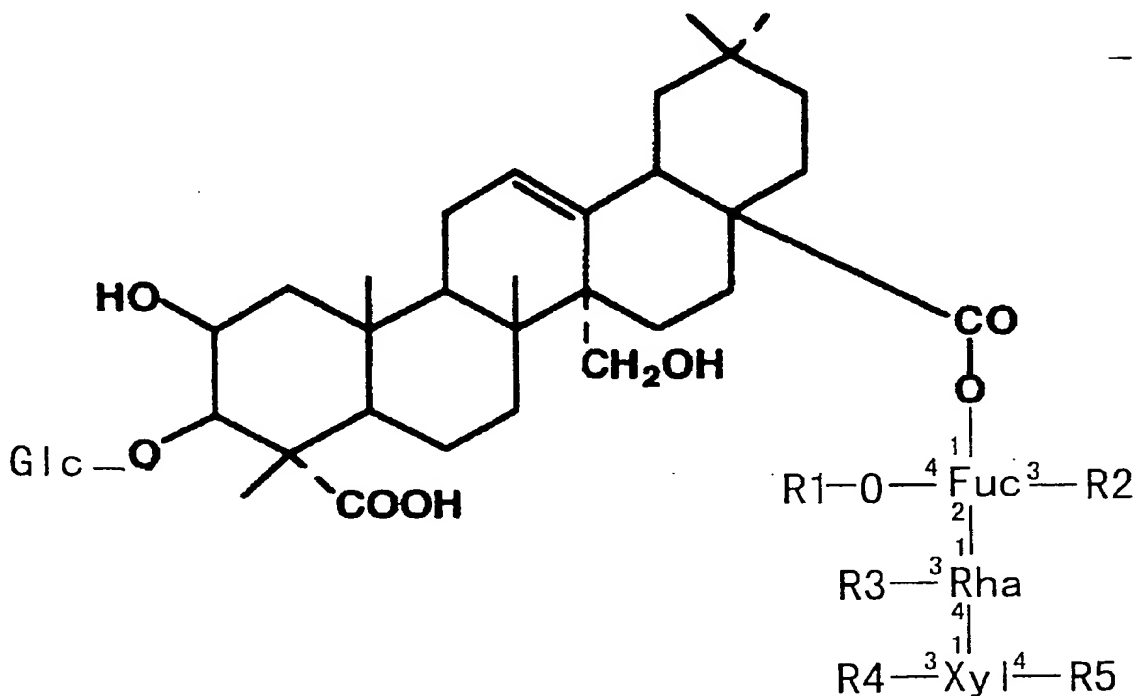
Adjuvants containing as the active ingredient saponins having a presenegenin skeleton as the mother nucleus and being substituted at the 28-position by an optionally substituted sugar residue; and vaccine preparations containing these adjuvants. For example, a sufficient immune stimulation activity can be exhibited even by transnasal vaccination by using a saponin having structure (I).



a ... SERUM HI ANTIBODY TITER (2ⁿ)
 b ... CONTROL
 c ... POLYGALA ROOT SAPONIN
 d ... MEAN ± STANDARD ERROR (n=10)



プレセネゲニン骨格を母核とし、その 28 位が糖残基または置換糖残基によって置換されているサポニンを有効成分として含むアジュバント、ならびにこのアジュバントを含むワクチン製剤により、前記課題を解決する。たとえば下記の構造を持つサポニンの利用により、経鼻接種においても十分な免疫刺激活性を示す。



PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦
AL アルバニア
AM アルメニア
AT オーストラリア
AU オーストラリア
AZ アゼルバイジャン
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ
BB バルバドス
BE ベルギー
BF ブルキナ・ファソ
BG ブルガリア
BN ベナン
BR ブラジル
BS ベルギー
CA カナダ
CF 中央アフリカ
CG コンゴ
CH スイス
CI コートジボアール
CM カメルーン
CN 中国
CR コスタ・リカ
CU キューバ
CY キプロス
CZ チェッコ
DE ドイツ
DK デンマーク

DM ドミニカ
EE エストニア
ES スペイン
FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GB 英国
GD グレナダ
GE グルジア
GH ガーナ
GM ガンビア
GN ギニア
GW ギニア・ビサウ
HR クロアチア
HU ハンガリー
ID インドネシア
IE アイルランド
IL イスラエル
IN インド
IS アイスランド
IT イタリア
JP 日本
KE ケニア
KG キルギスタン
KP 北朝鮮
KR 韓国

KZ カザフスタン
LC セントルシア
LI リヒテンシュタイン
LK スリ・ランカ
LR リベリア
LS レント
LT リトアニア
LU ルクセンブルグ
LV ラトヴィア
MA モロッコ
MC モナコ
MD モルドヴァ
MG マダガスカル
MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国
ML マリ
MN モンゴル
MR モーリタニア
MW マラウイ
MX メキシコ
NE ニジェール
NL オランダ
NO ノールウェー
NZ ニュージーランド
PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア

RU ロシア
SD スーダン
SE スウェーデン
SG シンガポール
SI スロヴェニア
SK スロヴァキア
SL シェラ・レオネ
SN セネガル
SZ スワジランド
TD チャード
TG トーゴ
TJ タジキスタン
TZ タンザニア
TM トルクメニスタン
TR トルコ
TT トリニダード・トバゴ
UA ウクライナ
UG ウガンダ
US 米国
UZ ウズベキスタン
VN ヴィエトナム
YU ユーゴスラヴィア
ZA 南アフリカ共和国
ZW ジンバブエ

明細書

サポニンを含むワクチン製剤

技術分野

本発明は、サポニンを有効成分とするアジュバント及びこれを含むヒトおよび動物の病気の予防または治療に有用なワクチン製剤に関するものである。

背景技術

ワクチンは、種々の疾病の予防に用いられ、天然痘のような特定の疾患に対しては数々の輝かしい成果をあげてきた。しかしながら、ワクチンの副反応や、また効果が充分でないという例も多くあって、その改善が強く望まれている。現在、人体用または動物用に使用されているワクチンの多くは、病原体あるいは病原体の一部を取り出し、ワクチンの抗原材料として用いる。従って、病原体を構成する成分や病原体を増殖させる媒体の成分がワクチンに混入する可能性を否定できない。これはワクチン接種の際、望ましくない副反応を引き起こす原因となりうる。また、免疫賦与に働く抗原部位そのものも多量に接種されると副反応を誘発する場合もある。

このようなことをできるだけ避け、安全性に優れたワクチンを製造する方法として、ワクチンの接種量を減少することや、ワクチン抗原の純度を高めること、接種ルートを変えることなどが行われてる。しかし、一般的には、このような変更に伴いワクチンの免疫力が低下しやすい問題点がある。免疫力の低下に対しては、従来アジュバントが利用されていた。しかし公知のアジュバントにおいては、有効性と安全性の向上など、改善すべき課題が残っている。

一般にほとんどのワクチンは注射により接種される。この結果、血中抗体価が上昇し、それが持続する場合、病原微生物による病気が予防される。一方、イン

フルエンザウイルスのような空気感染性の微生物は気道粘膜を介して感染するので、感染初期段階で罹患を阻止するためには、血中よりも粘膜での局所免疫を強力に誘発するワクチンが望ましい。このためにも局所免疫を誘発しやすくするアジュバントが求められている。すなわち、有効かつ安全で、必要な免疫を誘発しやすくする優れたアジュバントを開発することは、ワクチン開発にとって重要な課題である。

注射以外の接種ルートとして注目されるのが、経口接種、あるいは経鼻接種である。注射は医療技術者が行わなければならないので、たとえば医療施設が完備されていない状況で広い範囲にわたってワクチン接種を進めるときには障害となる。これに対して経口接種、あるいは経鼻接種では、ワクチン製剤さえ運搬すれば専門家の指導の下に直接の助けがなくとも接種が可能である。しかし、一般的にこのような接種ルートでは十分な免疫刺激を得にくいため、やはりアジュバントが必要となる。

従来、ワクチンにはアジュバントとしてアルミニウム化合物（硫酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウムなど）が広く用いられて来た。アルミニウム化合物のゲルは、現在、人体用ワクチンに用い得るほとんど唯一のアジュバントである。しかし、アルミニウムアジュバントにはたとえば次のような問題点があり、改善が求められている。すなわち、アルミニウムアジュバントは製造のロットごとに品質が異なりやすいので、大量生産に不向きであり、加えてカラム操作に馴染みにくいため精製操作が煩雑になる。また効果上の問題として、液性免疫の誘発力に優れているものの、細胞性免疫の誘発力が低いので、組み合わせる抗原に限界がある。

これらの改善を目的として、サポニンなど新しいアジュバントの研究、開発が進められている。それらを例示すれば次のものが挙げられる。

1. サポニン等、界面活性作用物質。
2. コレラトキシン等、細菌毒素。

3. B C G、ムラミルペプチド等、微生物または植物成分。
4. インターロイキンなど、サイトカイン類。
5. 合成ポリアニオン、ポリカチオンなど。
6. マイクロキャリアなど。

サポニン類は、植物体に含まれるトリテルペングリコシドやステロイドグリコシドを総称する化合物群である。サポニンを含む植物画分がアジュバント作用を有する場合のあることは古くから知られている。しかし、サポニンは複雑な構造を有し、アジュバント作用以外にも多彩な活性を示すので、いずれのサポニン化合物がアジュバント活性を担うのかを同定することは大きな困難を伴い、現在においても容易なことではない。

たとえば植物キラヤ・サポナリアのサポニン画分の一つキルAから、20 数種のサポニン化合物が分離され、そのうち QS-21 など複数の成分がアジュバント活性を示すことが明らかにされた（公表特許公報(A)、平 2-504266）。QS-21 は細胞性免疫誘発力が強く、アルミニウムアジュバントの欠点を補うアジュバントとして研究が続けられている。しかし、QS-21 は精製が困難で、構造が複雑であり、溶解性にも問題がある。従って、より有効で安価、安全なアジュバントの開発が求められている。たとえばサポニンは一般に強い溶血活性を示す。溶血は、貧血、臓器機能障害、栄養失調、あるいは血栓などの副反応症状の原因となることから、特に注射剤として接種する場合に問題となる。

また本発明者らは、数種の生薬から構成されている漢方薬の抽出液のあるものはアジュバント作用を有し、経鼻接種によるインフルエンザワクチンの構成成分として用いた場合、鼻腔洗液中および血清中でインフルエンザウイルスに対する抗体価を上昇させることを明らかにした（H. Yamada and T. Nagai, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 20 (3), 185-192, 1998）。しかし、アジュバント作用が抽出液中のどの化合物によってもたらされているのかについては、未だに明らかにされていない。

発明の開示

本発明の課題は、ワクチンの使用量を減らしたり接種ルートを変えても免疫力が低下しないようなワクチンを製造するため、ワクチンの免疫力を増強させる新しい方法を提供することにある。より具体的には、生薬中のサポニンから、より単純な構造で有効性と安全性の高いサポニンを見い出し、新規アジュバントとして開発することを課題としている。漢方薬は中国、日本やアジア各国で長年の臨床使用を通じて有効性と安全性が確立されているので、本課題の材料として優れて好適である。

すなわち、本発明の課題は、効果と安全性の高い新規なアジュバントとして、一群のサポニンをアジュバントとして提供し、かつ、これらを含むワクチンを提供し、有効で安全なワクチンの製造に貢献することである。

本発明者らは、上記課題の達成を目的として、二百数十種の生薬の熱水抽出エキスについて経鼻接種インフルエンザワクチンと同時に接種した場合にアジュバント活性を示すものの検索を行なった。その結果、生薬「遠志（オンジ）」の熱水抽出エキスが最も高い活性を示すことを発見した。更にオンジの熱水抽出エキスから抽出分離した有効成分を、NMR と高速液体クロマトグラフィーを利用して既存の物質と比較することにより同定した。その結果、特定の構造を持った化合物に強力な免疫刺激活性を見い出し、この化合物に高い安全性を期待できることを確認して本発明を完成した。すなわち本発明は、以下のアジュバント、ならびにこのアジュバントを用いたワクチン製剤に関する。

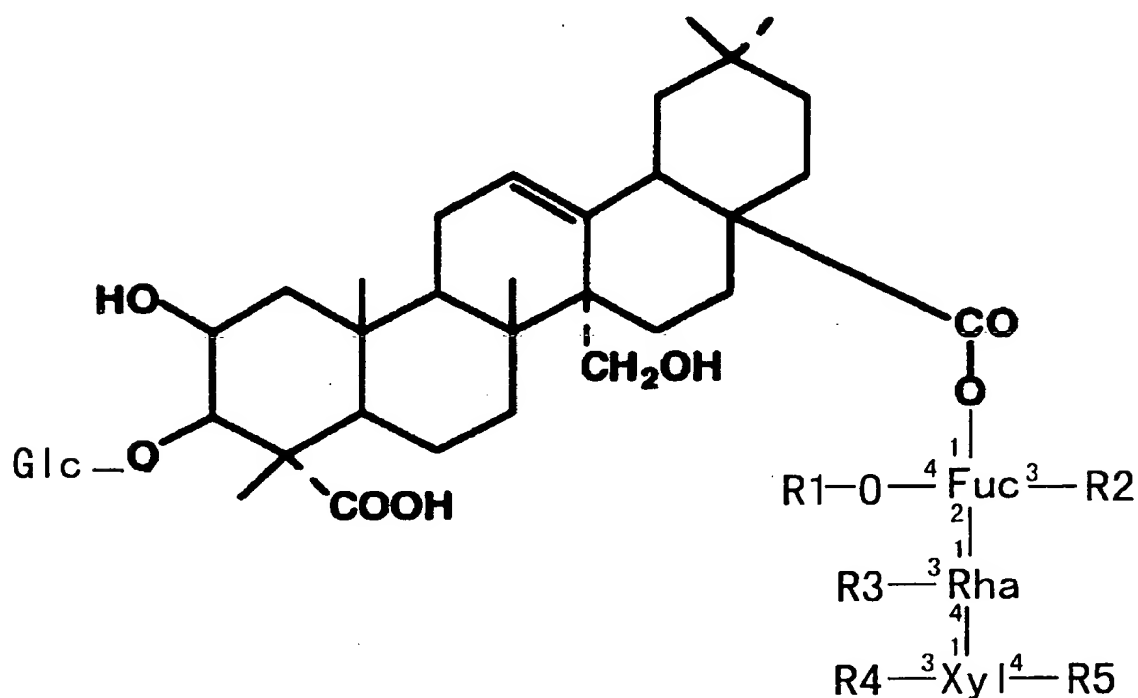
〔1〕 プレセネゲニン骨格を母核とし、その 28 位が糖残基または置換糖残基に

よって置換されているサポニンを含むアジュバント、ただし前記置換糖残基が 4 置換の場合はアピオース残基を必須の置換基として含む。

〔2〕 前記サポニンの 28 位に直接結合する糖残基または置換糖残基が、炭素数 3 以上の糖残基である〔1〕に記載のアジュバント。

〔3〕 前記サポニンの 28 位に直接結合する糖残基または置換糖残基が、フコース残基またはその置換体である〔2〕に記載のアジュバント。

〔4〕 サポニンが下記の構造で示される化合物である〔3〕に記載のアジュバント。



式中、Glc はグルコース残基を、Fuc はフコース残基を、Rha はラムノース残基を、Xyl はキシロース残基を表し、

R1 は、モノメトキシ桂皮酸残基、またはトリメトキシ桂皮酸残基を、

R2 は、H またはラムノース残基を、

R3 は、H またはアピオース残基を、

R4 は、H またはアラビノース残基を、そして

R5 は、H またはガラクトース残基を示す。

〔5〕 サポニンが、以下の群から選択される化合物の少なくとも 1 種を含むものである〔4〕に記載のアジュバント。

R1 がモノメトキシ桂皮酸残基、R2 がラムノース残基、R3 がアピオース残基、R4 が H、そして R5 がガラクトース残基である化合物、

R1 がトリメトキシ桂皮酸残基、R2、R3、R4 が H、そして R5 がガラクトース残基である化合物、

R1 がトリメトキシ桂皮酸残基、R2 が H、R3 がアピオース残基、R4 がアラビノース残基、そして R5 が H である化合物、

および、R1 がトリメトキシ桂皮酸残基、R2 が H、R3 がアピオース残基、そして R4 と R5 が H である化合物、

〔6〕 前記サポニンが生薬より調製したサポニンである〔1〕～〔5〕のいずれかに記載のアジュバント。

〔7〕 〔1〕～〔6〕のいずれかに記載のアジュバントを含むワクチン製剤。

〔8〕 経鼻接種、または経口接種のためのものである〔7〕に記載のワクチン製剤。

〔9〕 免疫抗原成分として、インフルエンザウイルス、ロタウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、おたふくかぜウイルス、エイズウイルス、百日せき菌、ジフテリア菌、ヘリコバクター・ピロリ菌、出血性大腸菌(EHEC)、クラミジア原虫、マイコプラズマ原虫、マラリア原虫、コクシジウム原虫、および住血吸虫で構成される群から選択される単一または複数の病原微生物の抗原を含む〔8〕に記載のワクチン製剤。

あるいは本発明は、プレセネゲニン骨格を母核とし、その 28 位が糖残基または置換糖残基によって置換されているサポニン（ただし前記置換糖残基が 4 置換の場合はアピオース残基を必須の置換基として含む）の、アジュバントとしての使用、並びにアジュバントの製造における使用に関する。更に本発明は、これらアジュバントのワクチン製剤としての使用、並びにワクチン製剤の製造における使用に関する。

本発明によるアジュバントを構成するサポニンは、オレアナン骨格を有するサ

ポニンの一部で、プレセネゲニン(presenegenin)を母核とする一群の化合物である。本母核構造はC A Sの命名法において olean-12-ene-23, 28-dioic acid, 2, 3, 27-trihydroxy-(2 β , 3 β , 4 α)と記載される。

アジュバント活性を有するサポニンとして構造が明らかにされた化合物には、QS-21 等が存在する。しかし本発明のサポニンは、QS-21 やその類縁サポニンとは明確に異なる。QS-21 もオレアナン骨格を有するサポニンの別の一部であるが、その母核はキライン酸(quillaic acid)で、ここに種々の糖、その他が結合した構造を有する。キライン酸母核構造はC A Sの命名法において、olean-12-en-28-oic acid, 3, 16-dihydroxy, 23-oxo-(3 β , 4 α , 16 α)と記述される。すなわち、本発明のアジュバントを構成するサポニンのプレセネゲニン母核は、23, 28-ジカルボキシルであり、かつ 2, 3, 27 位に水酸基を有する。一方、キライン酸母核は 23-アルデヒド-28-カルボキシルであり、かつ 3, 16 位が水酸基となる点で構造的には明確に区別される。

更に本発明によるアジュバントを構成する前記サポニンは、母核の 28 位のカルボキシル基に直接結合している糖残基が特異なアシル基で置換されている点、またこの糖残基が 4 置換以上であるときにはアビオース残基を必須の置換基として含む点において新規なサポニンアジュバントである。なお本発明において前記糖残基の置換数は、母核への結合を 1 として含む数を意味する。母核の 28 位に結合する糖残基としては、炭素数 3 以上の糖、糖アルコール、または糖酸が望ましい。このような糖残基として、具体的には、グリセロース残基、エリスロース残基、フコース残基 (Fuc で示す)、グルコース残基 (Glc で示す)、およびセドヘプチュロース残基を例示することができる。中でもフコース残基であるときには、溶血活性の低い優れたサポニンが含まれる。28 位のカルボキシル基に結合する糖がフコース残基である場合について、特に望ましいサポニンを一般式によって示せば前記のとおりである。これらの母核の 28 位に結合する糖残基は、更にアシル基、あるいは更に糖残基のような任意の置換基によって置換されていても良い。アシ

ル基としては、モノメトキシ桂皮酸残基 (monomethoxycinnamoyl 基、MC で示す) やトリメトキシ桂皮酸残基 (trimethoxycinnamoyl 基、TC で示す) を示すことができる。あるいは、乳酸、ピルビン酸、コハク酸等の有機酸、またオレイン酸等の高級脂肪酸による置換を示すこともできる。更に、このアシル基自体が、アミノ基、水酸基、ニトロ基、ニトリル基、リン酸基、あるいはハロゲン等で置換されている化合物を例示することもできる。加えてアシル基が糖残基と結合している化合物も含まれる。一方、置換基として示すことができる糖残基には、ラムノース残基 (Rha で示す)、アピオース残基 (Api で示す)、フコース残基、アラビノース残基 (Ara で示す)、キシロース残基、グルコース残基 (Glc で示す)、グルクロン酸残基、ガラクツロン酸残基、マンノース残基、マンニユロン酸残基、およびガラクトース残基を示すことができる。これらの糖残基は、通常は母核の 28 位に結合する前記フコース残基の 2 位、3 位、および 4 位のいずれか、もしくは複数の位置に結合することができる。たとえば前記一般式においては、R1 がアシル基によって、そして R2 が糖残基によって置換された化合物が例示される。

上記のような構造のサポニンが強いアジュバント活性を有することは先行文献の記述からは予測されないことである。たとえば QS-21 の構造活性相関研究において、母核の 23-アルデヒドが活性発現に重要であるとの見解が報告された (S. Soltysik, J.-Y. Wu, J. Recchia, D.A. Wheeler, M.J. Newman, R.T. Coughlin and C.R. Kensil, Vaccine, 13, 1403-1410, 1995)。しかし、本発明のサポニンはその 23 位がアルデヒドではなくカルボキシル基であるにもかかわらず、高いアジュバント活性を有する。このことは本発明者らの長年の研究によって初めて明らかにされた新しい知見である。

本発明のアジュバントを構成するサポニンは、前記構造によって特定されるプレセネゲニン母核を備えた化合物である。本発明で用いられるプレセネゲニン母核を備えたサポニンとして、具体的な物質名を例示すれば、たとえばオンジサポニン A、E、F および G を挙げることができる。これらの化合物の構造と製造方

法は公知である(S. Sakuma and J. Shoji, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 29, 2431-2441, 1981; S. Sakuma and J. Shoji, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 30, 810-821, 1981)。しかし、これまでワクチンにおけるアジュバント活性は知られていなかった。これらの化合物の構造を特定するために、R1-R5の置換基を表1にまとめた。表中の略号は、前記の置換基を示す。ここで表中に示したオンジサポニンについて、先に述べた母核の28位に結合するフコース残基の置換数を示せば、A:4、E:3、F:3、そしてG:3となる。

表1. 本発明のオンジサポニンの構造

オンジサポニン	R1	R2	R3	R4	R5
A	MC	Rha	Api	H	Gal
E	TC	H	H	H	Gal
F	TC	H	Api	Ara	H
G	TC	H	Api	H	H

本発明に用いるサポニンは天然物、例えば、生薬などの薬用植物を原料として公知の方法を組み合わせ、抽出、分離、精製し、製造することができる。合成化学的手段により製造することもできる。その例を示せば次のとおりである。

サポニン含有生薬であるオンジ(*Polygalae Radix*)、その原植物である *Polygala tenuifolia* Willd.、またはその他の同属植物をメタノール、エタノール、ブタノール等の低級アルコール、クロロホルム等の有機溶媒または水で抽出し、溶媒を留去した後、抽出エキスにつきシリカゲルカラムクロマトグラフィーなどで精製を行うことにより本発明に用いるサポニンを得ることができる。また場合によっては、含水有機溶媒で抽出を行った後、ヘキサン等の炭化水素類を用いて脱脂後、クロロホルム、ブタノールまたは水とクロロホルム、水とブタノールなどの混合

溶媒で分配し、有機溶媒可溶部の溶媒を留去し、抽出エキスにつきカラムクロマトグラフィーを行うことによっても得ることができる。あるいは必要に応じて、メタノール等を用いて再結晶することも可能である。

本発明のアジュバントをワクチンの有効成分として用いる使用形態は特に限定されない。すなわち、公知の種々の適切な使用形態が可能であり、物理的混合や抗原蛋白との化学的結合物でもよい。リボソームなどのキャリアーに内包させてもよい。本発明のアジュバントを構成するサポニンは、1種類で用いても良いし、あるいは複数種を混合して用いることもできる。

更に本発明のアジュバントは、公知のアジュバントの1種以上と同時に使用することができる。たとえば実施例5には本発明のサポニンとアルミニウムアジュバントを含む百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンの例を示す。本発明によるアジュバントは、アルミニウムアジュバントとの同時使用においても粘膜免疫活性を誘発する。本発明のアジュバントとして用いるサポニンの種類、あるいは組み合わせるべき公知のアジュバントは、免疫原となる抗原の種類、接種する動物種、あるいは安全性等の考慮すべき条件に合わせて、好適な組み合わせを経験的に見い出すことができる。その結果、抗原の量を低下させたり、もう一方のアジュバントの量を低下させ、望ましくない副反応を低下させ、望ましい免疫反応を増強することができる。

考慮すべき安全性の指標の一つとして、サポニンの溶血活性がある。特にヒトに対して用いる場合には、前記サポニンの中で、たとえばオンジサポニンE、F、およびGとして示したサポニンが溶血活性の低さの点で有利である。これらのサポニンは、28位のカルボキシル基に結合する糖残基がフコースであり、更にフコース残基のR2がHである点において共通の構造を持つ化合物である。しかしながら、オンジサポニンAとして示したようなサポニンの溶血活性は、必ずしも許容されないものではない。たとえば血中に直接移行しにくい接種ルートを選択して用いたり、アジュバントの接種回数を限定して許容できる水準内で用いることが

可能である。その他、公知の化学修飾の手法により溶血活性の低い成分（たとえばオンジサポニンE）に誘導したり、その他の誘導体に導くための材料としても利用することができる。

本発明によるアジュバントに基づいて、新規なワクチン製剤が提供される。本発明におけるワクチン製剤は、狭義と広義のワクチンを含む。すなわち、1) ヒト及び動物におけるウイルス、細菌、真菌、原虫、その他の微生物による感染症に有効な狭義のワクチンを含む。その一部を例示すれば、インフルエンザワクチン、百日せきワクチン、精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン、日本脳炎ワクチン、B型肝炎ワクチン、ロタワクチン、麻しんワクチン、風しんワクチン、おたふくかぜワクチン、麻しん風しんおたふくかぜ混合ワクチン、麻しん風しん混合ワクチン、およびヘモフィルスインフルエンザワクチン等の各種ワクチンが挙げられる。さらには、多剤耐性黄色ブドウ状球菌（MRSA）ワクチン、ヘリコバクターピロリ（以下H.ピロリと省略する）ワクチン、出血性大腸菌（EHEC）ワクチン、サルモネラワクチン、クラミジアワクチン、マイコプラズマワクチン、エイズワクチン、マラリアワクチン、コクシジウムワクチン、あるいは住血吸虫ワクチンを含む。2) さらに広義のワクチンとして、がんワクチン、不妊ワクチン、胃潰瘍ワクチン、糖尿病ワクチン及び動脈硬化症ワクチンなど非感染症の予防や治療に有効なワクチンを含む。

これらのワクチンは製造方法により分類される種々のワクチンを含む。すなわち、弱毒化生ワクチン、不活化ワクチン、コンポーネントワクチン、DNAに基づくワクチンなどを含む。DNAに基づくワクチンの中には、プラスミドなどのキャリアーに組み込んだDNA断片を含むワクチンのほか、リボザイムやアンチセンスオリゴヌクレオチドなどを併用するワクチンが含まれる。なお、DNA断片、リボザイム、あるいはアンチセンスオリゴヌクレオチドに対しては、本発明のサポニンアジュバントにより透過性の亢進が期待できる。これらのワクチンは、治療用でも予防用でも良い。また、ワクチンの効果にとって有効な抗原成分を遺

伝子組み換え技術を応用して組み換え生物細胞に生産させたものを用いる組み換えワクチンも含まれる。これらのワクチンは単味ワクチンでも混合ワクチンでも良い。これらのワクチンの製造方法や使用形態を例示すれば次の通りである。

インフルエンザワクチン；発育鶏卵、または、ベロ細胞など動物細胞培養技術により増殖させたウイルスをエーテル、界面活性化剤などで分解精製して得られる、あるいは遺伝子組み換え技術や化学合成によって得られる赤血球凝集素（H A）、ノイラミニダーゼ（N A）、核蛋白質（N P）、マトリックス蛋白質（M）あるいはその一部などを含むスプリットワクチン。または、これらの蛋白質の遺伝子を含むD N A断片をふくむ経鼻接種用D N Aワクチン。

百日せきワクチン；百日せき菌を培養した培養液あるいは菌体より塩析、超遠心分離などを用いて抽出し、ホルマリンで無毒化した不活化ワクチン、または、遺伝子組み換え技術や変異剤処理で誘起した人工変異株生産物として得られる変異体の百日せき菌毒素（P T）、赤血球凝集素（F H A）、69K 膜タンパク質、あるいは、その部分ペプチドなどを含むワクチン。

百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン；百日せきワクチンにジフテリアトキシソイドおよび破傷風トキシソイドを混合した三種混合ワクチン。

日本脳炎ワクチン；マウス脳内で増殖したウイルス、またはベロ細胞など動物細胞培養技術により増殖したウイルスを超遠心分離あるいはエチルアルコールなどを用いてウイルス粒子を精製した後、ホルマリンで不活性化したもの、あるいは遺伝子組み換え技術や化学合成などによって得た抗原蛋白質を含むワクチン。

B型肝炎ワクチン；B型肝炎キャリアの血液を原材料とし、塩析、超遠心分離を用いてHBs 抗原を分離精製したプラズマワクチン、あるいは遺伝子組み換え技術や化学合成などによって得た抗原部位などを含む組み換えワクチン。

麻疹ワクチン；ニワトリ胎児細胞などの培養細胞、あるいは、発育鶏卵で増殖させた弱毒ウイルス生ワクチン、あるいは、ウイルスの一部、または、遺伝子組み換え技術や化学合成によって得た感染防御抗原を含む組み換えワクチン。

風しんワクチン；ニワトリ胎児細胞などの培養細胞、あるいは、発育鶏卵で増殖させたウイルス、あるいは、その一部、または、遺伝子組み換え技術や化学合成によって得た感染防御抗原を含むワクチン。

おたふくかぜワクチン；家兎細胞などの培養細胞あるいは発育鶏卵で増殖させたウイルス、または、その一部、あるいは、遺伝子組み換え技術や化学合成によって得た感染防御抗原を含む弱毒生ワクチン。

麻しん風しん混合ワクチン；麻しんワクチン、風しんワクチンを混合した二種混合ワクチン。

麻しん風しんおたふくかぜ混合ワクチン；麻しんワクチン、風しんワクチン、おたふくかぜワクチンを混合した三種混合ワクチン。

ロタワクチン；MA104 細胞など培養細胞で増殖させたウイルス、または患者の糞便中より得たウイルス、または、その一部、あるいは遺伝子組み換え技術や化学合成により得た感染防御抗原を含むワクチン。

マイコプラズマワクチン；マイコプラズマ増殖用培地で増殖したマイコプラズマ、または、その一部、あるいは、遺伝子組み換え技術や化学合成などにより得られた感染防御抗原を含むワクチン。

エイズワクチン；培養細胞で増殖させたウイルス、または患者より得たウイルス、または、その一部、あるいは遺伝子組み換え技術や化学合成により得た感染防御抗原を含むワクチン、あるいは有効なDNA断片を含むDNAワクチン。

H.ピロリワクチン；培養したH.ピロリ菌体の破砕物、または、H.ピロリ培養物から分離したウレアーゼ、熱ショック蛋白質、トキシンなどを抗原とするワクチン、あるいは、遺伝子組み換え技術により生産されたこれらの抗原蛋白質からなる注射用あるいは経口、経鼻接種用ワクチン。

上記ワクチンは液状または粉末状で提供される。粉末状とする場合には、凍結乾燥等の手法により、粉末製剤とすることができる。液状製剤であれば、鼻腔内接種（鼻腔内スプレー、滴下、塗布など）や注射の場合に適している場合が多い。

あるいは鼻腔内接種の場合は、粉末スプレー方式も可能である。また本発明によるワクチン製剤には、公知の安定剤や防腐剤を配合することができる。安定剤には、0.1-0.2%程度のゼラチンやデキストラン、0.5-1%のグルタミン酸ナトリウム、あるいは約 5%の乳糖や約 2%のソルビトール等が用いられる。防腐剤としては、0.01%程度のチメロサルや 0.1%程度の β -プロピオノラクトンが公知である。

本発明によるワクチン製剤におけるワクチン抗原とサポニンの混合比率としては、たとえば 1:0.0001~1:10,000（重量比）を例示することができる。この範囲はあくまでも一般的な範囲であり、ワクチンの種類に応じて好適な比率を決定して用いる。その為に必要な方法は、この領域の専門家にとって、公知である。

本発明のワクチン製剤は、上記免疫原に本発明のアジュバントを所定の量比で混合することにより調製される。調製は厳密に無菌的に行なわなければならない。それぞれの原材料も完全に無菌的でなければならない。勿論、ワクチン作用以外に必要なないパイロジェンやアレルギー源となるような夾雑蛋白質は可能な限り除去しておかななければならない。この領域の専門家にとって、その為に必要な方法は公知である。本発明のワクチン製剤は、ワクチン抗原と本発明のサポニンをそれぞれ別々に調製、製剤化しておき、用時に混合してから接種するか、または、別々に、ほぼ同時に接種するという方法によっても、効果を発揮させることができる。

ワクチン接種法

本発明によるワクチン製剤の使用方法は公知のどの方法も使用できる。

接種量はマウスの場合、鼻腔内で 5 μ L~50 μ L、ヒトの場合は鼻腔内接種、注射いずれの場合も 0.1~1.0 mL が好適である。これらの量は適宜変更し得る。また、免疫抗原との組み合わせについては、たとえば、次に示すような免疫抗原では、ワクチン効果の点で、あるいは接種操作の点で、経鼻接種や経口接種が望ましいとされている。

インフルエンザウイルス、ロタウイルス、麻しん、風しん、おたふくかぜ、エ

イズ、百日せき菌、ジフテリア、H.ピロリ、出血性大腸菌(EHEC)、クラミジア、マイコプラズマ、マラリア原虫、コクシジウム原虫、および住血吸虫。

これらの免疫抗原は、単独で接種される場合もあるし、百日せき・ジフテリア・破傷風三種混合ワクチン、あるいは麻しん・風しん二種混合ワクチンのような形で同時接種の形を採用することもできる。経鼻接種や経口接種が望ましい理由は、いずれも気道や消化管の粘膜が感染ルートとなっているためである。感染ルートである局所粘膜における免疫機構を誘導するためには、それに適した免疫刺激活性の強いアジュバントが望ましい。あるいは、マラリア原虫ワクチンのように必ずしも十分な医療設備の期待できない地域で使用される機会が多いワクチンについては、医者や看護婦といった専門の医療技術者でなくても接種が可能な経鼻接種や経口接種といった接種ルートが望まれる。

図面の簡単な説明

図1は、本発明のワクチン製剤のうち、ワクチンとしてインフルエンザワクチンを用いたものを経鼻接種したときの血清中の一次抗体産生の結果を示すグラフである。図中、縦軸は抗体価（2ⁿHI 単位）を、横軸は使用したアジュバントの種類を示す。

図2は、本発明のワクチン製剤のうち、ワクチンとしてインフルエンザワクチンを用いたものを経鼻接種したときの血清中の二次抗体産生の結果を示すグラフである。図中、縦軸は抗体価（2ⁿHI 単位）を、横軸は使用したアジュバントの種類を示す。

図3は、本発明のワクチン製剤のうち、ワクチンとしてインフルエンザワクチンを用いたものを経鼻接種したときの鼻腔洗液中の二次抗体産生の結果を示すグラフである。図中、縦軸は抗体価（ELISA 単位）を、横軸は使用したアジュバントの種類を示す。

図4は、本発明のワクチン製剤のうち、ワクチンとして百日せきジフテリア破

傷風混合ワクチンを用いたものを経鼻接種したときの血清中の二次抗体産生の結果を示すグラフである。図中、縦軸は抗体価(ELISA 単位)を、横軸は使用したアジュバントの種類を示す。

図5は、本発明のワクチン製剤のうち、ワクチンとして百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンを用いたものを経鼻接種したときの鼻腔洗液中の二次抗体産生の結果を示すグラフである。図中、縦軸は抗体価(ELISA 単位)を、横軸は使用したアジュバントの種類を示す。

図6は、本発明によるアジュバントの溶血活性を示すグラフである。図中、縦軸は放出ヘモグロビン量(490nmにおける吸光度)を、横軸はサボニンの最終濃度($\mu\text{g/mL}$)を示す。

図7は、本発明のワクチン製剤のうち、ワクチンとしてインフルエンザワクチンを用い、低用量のアジュバントを用いたものを経鼻接種したときの血清中の二次抗体産生の結果を示すグラフである。図中、縦軸は抗体価(2° HI 単位)を、横軸は使用したアジュバントの種類を示す。

図8は、本発明のワクチン製剤のうち、ワクチンとしてインフルエンザワクチンを用い、低用量のアジュバントを用いたものを経鼻接種したときの鼻腔洗液中の二次抗体産生の結果を示したグラフである。図中、縦軸は抗体価(ELISA 単位)を、横軸は使用したアジュバントの種類を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下本発明の実施例を示すが、本発明は何らこれらに限定されるものではない。

実施例1. サボニンの調製-1

オンジサボニンA、E、FおよびGの製造方法を示す。オンジサボニンA、E、FおよびGは、庄司らの方法(S. Sakuma and J. Shoji, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 29, 2431-2441, 1981; S. Sakuma and J. Shoji, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 30, 810-821, 1981)に準じて製造した。

すなわち、オンジ(500g)をメタノール 1 L を用いて還流し、メタノール可溶性画分を得た。残渣について同様の操作を 6 回繰り返す、メタノール可溶性画分を減圧乾固することによりメタノールエキスを得た (収量 ; 150 g、収率 ; 30%)。本エキスを精製水に溶解後、ベンゼン 1 L を用いて振盪抽出する操作を 3 回繰り返す、脂質画分を除去した。得られた水層をさらに水飽和ブタノール 1.5 L を用いて振盪抽出する操作を 6 回繰り返す、ブタノール可溶性画分を得た。このブタノール可溶性画分を減圧乾固後、再度ブタノール 3 L に溶解し、約 1/5 にまで減圧濃縮し、析出した沈殿を粗サポニン画分として分取した (収量 ; 40 g、収率 ; 8%)。本粗サポニン画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにおいて水飽和ブタノールを用いて分画し、オンジサポニン D、E、F および G の混合物画分(Fr. 1) とオンジサポニン A、B および C の混合物画分(Fr. 2)を得た。この Fr. 1 と 2 を各々シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画し[溶出液;クロロホルム-メタノール-エタノール-10% 酢酸=8:4:1:2 (上層を使用)]、Fr. 1 からは粗精製オンジサポニン F 画分、G 画分および D、E 混合物画分を、また Fr. 2 からは粗精製オンジサポニン A 画分、B 画分および C 画分を得た。オンジサポニン D、E 混合物画分はさらにシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画し[溶出液 ; ブタノール-酢酸エチル-水=4:1:2 (上層を使用)]、粗精製オンジサポニン D 画分および E 画分を得た。これらの粗精製オンジサポニン画分をさらにセファデックス LH-20 を用いて精製し (溶出液 ; メタノール)、各々精製オンジサポニン A (収率 ; 0.52%)、B (収率 ; 0.77%)、C (収率 ; 1.07%)、D (収率 ; 0.29%)、E (収率 ; 0.28%)、F (収率 ; 0.94%)、および G (収率 ; 0.11%) を得た。

実施例 2 . サポニンの調製 - 2

オンジサポニン A、E、F および G を製造するに際し、種々の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による製造方法を試みた。

すなわちオンジ 500g を精製水 10 L で液量が半量になるまで煎出した後、ステ

ンレスメッシュを用いてろ過し、残渣については再度精製水 10 L を加え同様の操作を行った。抽出液は合わせてガラス繊維ろ紙を用いて濾過し、得られたろ液を凍結乾燥することにより熱水抽出エキスを得た。本熱水抽出エキス 133.90 g を精製水 1.79 L で溶解させ、遠心分離することにより上清を得た。上清に 4 倍量のエタノールを加え、室温で一晩攪拌することによりエタノール沈殿を行った。沈殿を分別するため、この溶液を一日間静置することにより沈殿を沈降させ、上清と沈殿を分別し、さらに分別できなかった部分については遠心分離を行った。得られた上清を合わせて溶媒を減圧留去することにより、エタノール沈殿上清画分を得た。このエタノール沈殿上清画分を水 1 L で再溶解した後、ヘキサン 600 mL を用いて振盪抽出し、脂質画分を除去した。水層について、さらにクロロホルム 1 L、次いで水飽和 n-ブタノール 3 L を用いて振盪抽出し、溶媒を減圧留去することにより、クロロホルム可溶性画分およびブタノール可溶性画分を得た。

これらの、クロロホルム可溶性画分およびブタノール可溶性画分を水 1 L で懸濁後、透析膜（排斥分子量 10,000）を用いて、10 日間精製水に対し透析し、透析内液の溶媒を減圧留去することにより、クロロホルム可溶性およびブタノール可溶性の非透析性活性画分を得た。得られた画分をハイドロキシアパタイトカラムを用いた HPLC により水とアセトニトリルの混合溶媒を溶出液として分画し、オンジサポニン A、E、F および G の混合物を得た。

更にこれらの活性混合物画分をフェニルカラムを用いた HPLC により水とアセトニトリルの混合溶媒を溶出液として分画し、オンジサポニン A、E、F および G を含む画分を得た。なお、この精製法のうちハイドロキシアパタイトを用いた HPLC の過程を経なくてもオンジサポニン A、E、F および G は取得できる。

プレセネゲニン母核のサポニンがアジュバントとして有効であることを確認する方法は、公知の生物学的方法による。オンジサポニン A、E、F および G が各種ワクチンに対し、抗体産生増強活性を有し、アジュバントとして有効であることを確認した実施例を以下に示す。

実施例 3 . 鼻腔内接種されたインフルエンザ HA ワクチンに対する抗体産生増強作用

精製インフルエンザウイルス (A/PR/8/34 株) よりエーテル処理によって脂質成分を除去して調製した HA ワクチン (HA 量として 0.5mg/mL) と実施例 1 に記載した方法で精製したオンジサポニン A、E、F または G の生理食塩水溶液 (1 mg/mL) を等量混合することにより接種材料を調製した。なおここで用いたオンジサポニンの各分画における純度は、少なくとも約 95% 以上であった。BALB/c マウス (7 週齢の雌) をアモバルビタールで麻酔後、左側鼻腔にマイクロピペットで 20 μ L の接種材料を滴下した。4 週間後、エーテル麻酔条件下で、マウスの心臓より全採血によって血液を回収し、血清を調製した。血清は先ず RDE (receptor destroying enzyme, 受容体分解酵素) 処理によって非特異的赤血球凝集物質を除去した。この血清を U 型マイクロタイタープレート上で 2 倍階段希釈し、16HA 単位のウイルスと混合し、30 分間室温放置後、ニワトリ赤血球を加え、室温で 1 時間放置後、赤血球凝集抑制 (HI) 抗体価を判定した。

図 1 はオンジサポニン A、E、F および G の血清中の HI 抗体価に対する影響を示したものであるが、HA ワクチンを単独で鼻腔内接種したときには、低いレベルの HI 抗体しか検出されなかった。しかし、オンジサポニン A、E および F を HA ワクチンと共に接種すると血清中の HI 抗体価が、単独の場合よりも 8~14 倍上昇した。また、オンジサポニン G も HI 抗体価を 3~5 倍高めた。以上の結果は、オンジサポニンが、共存するインフルエンザ HA ワクチンに対する抗体産生を増強することを示している。

実施例 4 . インフルエンザ HA ワクチンに対する二次抗体産生増強作用

実施例 3 と同様のインフルエンザ HA ワクチン (1mg/mL) と試料の生理食塩水溶液 (1mg/mL) を等量混合し、接種材料を調製した。雌性、7 週齢の BALB/c マウス

にアモバルビタールナトリウムを腹腔内接種して麻酔した。接種材料 20 μ L をマウスに経鼻接種した。マウスを 3 週間飼育後、ワクチンのみをさらに二次経鼻接種した。さらに 1 週間飼育後、血清および鼻腔洗液を調製した。血清中の抗インフルエンザウイルス抗体価は HI 抗体価により測定した。鼻腔洗液は、放血後のマウスの左右の鼻腔より 1 mL の 0.1% 牛血清アルブミン (BSA) を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を 2 回ずつ灌流することによって回収した。鼻腔洗浄液中の抗 HA-IgA および抗 HA-IgG 量は酵素免疫測定法 (ELISA) によって測定した。抗 HA-IgA の定量の際には、コーティング緩衝液 (0.01M 炭酸-重炭酸ナトリウム緩衝液、pH9.6) に懸濁した HA ワクチン (5 μ g/mL) 100 μ L で、先ず 96 穴の EIA プレート (リンブロー社製) の各孔 (well) をコーティングした。室温に 2 時間放置後、ツィーン 20 添加 PBS (以下 PBS-ツィーンと記す) でプレートを洗浄した。次に、1% BSA および 0.1% NaN_3 を含む PBS、200 μ L で各孔をコーティングした。4°C に一晩放置後、PBS-ツィーンで洗浄し、次に各孔に鼻腔洗浄液のプロテイン G-セファロース 4 F F (ファルマシアバイオテク社製) 未吸着画分を 100 μ L ずつ入れた。室温に 2 時間放置後、PBS-ツィーンで洗浄し、次に各孔に 100 μ L ずつ BSA および 0.1% NaN_3 を含む PBS で希釈したアルカリホスファターゼ標識ヤギ抗マウス IgA (α 鎖特異的、1:1000) を加えた。室温に 1 晩放置後、PBS-ツィーンで洗浄し、各孔に 10% ジェタノールアミン緩衝液 (pH 9.8) に溶解した p-ニトロフェニルリン酸ナトリウム (1 mg/mL ; シグマ社製) を加えた。室温で 20~30 分放置後、発色をプレートリーダー (MRX-MD 型、ダイネックス社製) を用いて O.D. (405 nm) で測定した。抗 HA-IgG の定量の際には、資料として鼻腔洗浄液のプロテイン G-セファロース 4 F F 吸着画分を用い、2 次抗体としてアルカリホスファターゼ標識ウサギ抗 IgG (γ 鎖特異的、1:1000) を用いた。

図 2 はオンジサボニン A、E、F および G の二次応答による血清中の抗インフルエンザウイルス抗体産生に対する影響を示したものである。オンジサボニン A、E、F および G は血清中の HI 抗体価を HA ワクチン単独の場合よりも 27~50 倍上

昇させた。また、これらオンジサポニンのアジュバント活性は陽性対照として用いた同用量のコレラトキシン B サブユニット (CTB; 公開特許公報 (A) 平 2-243633) と同程度であった。

図 3 はオンジサポニン A、E、F および G の二次応答による鼻腔洗液中の抗インフルエンザウイルス IgA および IgG 抗体産生に対する影響を示したものである。ワクチンのみを一次鼻腔内接種したときには、極めて低いレベルの抗 HA-IgA および IgG 抗体しか検出されなかった。これに対し、オンジサポニン A とワクチンを一次接種したグループでは CTB とワクチンを一次接種したグループと同程度に最も強く鼻腔洗液中の抗 HA-IgA および IgG 抗体価を上昇させた。またオンジサポニン F も抗 HA-IgA および IgG 抗体産生を高めていたが、オンジサポニン E および G は抗 HA-IgA のみを統計学的に有意に上昇させた。

これらの結果は、一次接種に用いられたオンジサポニンが、二次接種による抗体産生を非常に強く誘導する作用があることを示している。即ち、オンジサポニンが共存する HA ワクチンに対するメモリー効果を強く誘導する作用があることを示している。

実施例 5. 百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンに対する抗体産生増強作用

北里研究所製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン (百日せき 15 μ g/mL、破傷風 2LF/mL、ジフテリア 20LF/mL、水酸化アルミニウムゲル 0.27mg/mL を含む) と実施例 3 で用いたオンジサポニンの生理食塩水溶液 (1 mg/mL) を混合し、接種材料を調製した。雌性、7 週齢の BALB/c マウスにアモバビタールナトリウムを腹腔内接種して麻酔した。接種材料 20 μ L をマウスに経鼻接種し、さらに 4 週間後に同量のワクチンのみを追加接種した。マウスを 2 週間飼育後、血清および鼻腔洗液を採取した。血清中の抗百日せきトキシン (PT) -IgG、抗ジフテリアトキソイド (DT) -IgG、抗破傷風トキソイド (TT) -IgG 抗体価および鼻腔洗液中の抗 PT-IgA、抗 DT-IgA および抗 TT-IgA 抗体価は ELISA により測定した。

図4はオンジサポニンA、E、FおよびGの血清中の抗PT-IgG、抗DT-IgGおよび抗TT-IgG抗体価に対する影響を示したものであるが、百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンのみを接種したグループでは、抗PT-IgG抗体価、抗DT-IgG抗体価、抗TT-IgG抗体価はいずれも低レベルであったのに対し、オンジサポニンAをワクチンに添加したものを一次接種したグループおよびCTB（コレラトキシンBサブユニット）をワクチンに添加したものを一次接種したグループは同程度に最も強く血清中の抗PT-IgG、抗DT-IgGおよび抗TT-IgG抗体価を上昇させた。オンジサポニンFも血清中の抗PT-IgG、抗DT-IgGおよび抗TT-IgG抗体価を高めていたが、オンジサポニンGは血清中の抗TT-IgG抗体価のみを統計学的に有意に上昇させた。キラヤ・サポナリアの樹皮由来のサポニン混合物キルAは他の試料と同量用いても全く血清中の抗PT-IgG、抗DT-IgGおよび抗TT-IgG抗体価に対してアジュバント活性を示さなかった。

図5はオンジサポニンA、E、FおよびGの鼻腔洗液中の抗PT-IgA、抗DT-IgAおよび抗TT-IgA抗体価に対する影響を示したものである。百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンのみを接種したグループでは、抗PT-IgA抗体価、抗DT-IgA抗体価、抗TT-IgA抗体価は、いずれも低レベルであったのに対し、オンジサポニンAまたはFをワクチンと共に一次接種したグループではCTBをワクチンと共に一次接種したグループと同程度に最も強く鼻腔洗液中の抗PT-IgA、抗DT-IgAおよび抗TT-IgA抗体価を上昇させた。また、オンジサポニンGは鼻腔洗液中の抗DT-IgAおよび抗TT-IgA抗体価を高めていた。キルAは鼻腔洗液中の抗PT-IgA抗体価を弱く上昇させたが、抗DT-IgAおよび抗TT-IgA抗体価に対してはアジュバント活性を示さなかった。

実施例6．活性サポニンの溶血性試験

一般にサポニン類は溶血活性を示すことが知られている。そこで、本発明の活性サポニンの溶血活性を検討するために以下のように溶血性を測定した。綿羊赤

血球をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で3回洗浄後、同緩衝液で2.5倍希釈し実験に用いた。オンジサポニンA、E、FおよびGの溶液(200, 100, 50, 25, 6.25, 3.125 $\mu\text{g/mL}$ -PBS 溶液) 100 μL を分注した96穴のV底マイクロプレートに25 μL の綿羊赤血球懸濁液を加え、30分間室温で放置した後、1000 rpm で5分間遠心した。その上清50 μL を平底プレートに移し、マイクロプレートリーダー(モデル450、バイオラッド社製)で490 nmの吸光度を測定した。試験化合物の溶血活性は、綿羊赤血球からのヘモグロビンの放出による490 nmの吸光度の上昇で判定した。図6はオンジサポニンA、E、FおよびGの溶血活性を示したものである。各化合物の間で溶血性に大きな違いが認められた。オンジサポニンEおよびFでは終濃度が200 $\mu\text{g/mL}$ においてもほとんど溶血性は認められなかったのに対し、オンジサポニンGでは中間程度の溶血性が認められ、オンジサポニンAは明らかに溶血性を示した。

実施例7. インフルエンザHAワクチン-オンジサポニン製剤(注射剤)の調製

インフルエンザHAワクチン(HA 1 mg/mL)と、PBSに溶解し濾過滅菌したオンジサポニンEとFを含む画分を混合し、0.5 mL中にインフルエンザHAワクチン5~10 μg とオンジサポニン10 μg を含む様に調製した。これを容器に分注して、インフルエンザHAワクチン-オンジサポニン注射剤とした。本品は10°C以下の冷暗所に保存することができる。

上記のように調製したインフルエンザHAワクチンおよびサポニンをマウスに接種し、4週間後の抗体産生を調べた。試験成績から、インフルエンザHAワクチンのみを接種されたマウスで血中のHI抗体は、 2^8 であったのに対し、サポニン添加ワクチンでは、 $2^{11.6}$ であった。

実施例8. 百日せきワクチン-オンジサポニン製剤(点鼻剤)の調製

百日せきワクチンと、PBSに溶解し濾過滅菌したオンジサポニンFを混合し、

20 μ L 中に百日せきワクチンが蛋白質窒素として 15 μ g とオンジサポニンを 10 μ g 含むように調製した。これに防腐剤 (0.005%チメロサル) を加え、容器に分注して、百日せきワクチン-オンジサポニン経鼻接種剤とした。本品は 10°C 以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した百日せきワクチンおよびサポニンをマウスの鼻腔内に接種し、さらに 4 週間後に同量のワクチンを追加接種し、抗体産生を調べた。試験成績から、百日せきワクチンのみを接種されたマウスでは、血中の抗 PT-IgG 抗体は、156.3 ELISA 単位であったのに対し、サポニンを添加したものでは、334.2 ELISA 単位であった。また、鼻腔洗液中の抗 PT-IgA 抗体は、百日せきワクチンのみを接種されたマウスでは、6 ELISA 単位であったのに対し、サポニン添加ワクチンでは、12 ELISA 単位であった。

実施例 9. B 型肝炎ワクチン-オンジサポニン製剤 (注射剤) の調製

B 型肝炎ワクチンと、PBS に溶解し濾過滅菌したオンジサポニン F と G を含む画分を混合し、1 mL 中に HBs 抗原が蛋白質として 40 μ g と、オンジサポニン 10 μ g を含むように調製した。これに防腐剤 (0.01%チメロサル) および安定剤 (0.2% 豚製ゼラチン) を加え、容器に分注して B 型肝炎ワクチン-オンジサポニン注射剤とした。本品は 10°C 以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した B 型肝炎ワクチンおよびサポニンをマウスに接種し、3 週間後の血中の抗体産生を調べた。試験成績から、B 型肝炎ワクチンのみを接種されたマウスでは、受身赤血球凝集反応で、 $2^{3.6}$ 単位であったのに対し、サポニンを添加したものでは $2^{6.2}$ 単位であった。

実施例 10. 日本脳炎ワクチン-オンジサポニン製剤 (注射剤) の調製

日本脳炎ワクチンと、PBS に溶解し濾過滅菌したオンジサポニン F と G を含む画分を混合し、1 mL 中に $10^{7.0}$ PFU 相当量の不活化日本脳炎ウイルス粒子と、オ

ンジサポニン 10 μg を含むように調製した。これに安定剤 (0.2%豚製ゼラチン) を加え、容器に分注して日本脳炎ワクチン-オンジサポニン注射剤とした。本品は 10°C以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した日本脳炎ワクチンおよびサポニンを 1 週間隔で 2 回マウスに接種し、血中の抗体量をみた。試験成績から、日本脳炎ワクチンのみを接種した場合に産生される中和抗体価は $10^{1.88}$ であったのに対し、サポニンを添加したものでは $10^{2.90}$ であった。

実施例 1 1. 麻しんワクチン-オンジサポニン製剤 (点鼻剤) の調製

麻しんワクチンと、PBS に溶解し濾過滅菌したオンジサポニン E を混合し、20 μL 中に麻しんワクチン 20 μg 相当量のウイルス粒子と、オンジサポニン 2.5 μg を含むように調製した。これに安定剤 (0.2%豚製ゼラチン、0.1%グルタミン酸ナトリウム、5%乳糖) を加え、容器に分注して麻しんワクチン-オンジサポニン点鼻剤とした。本品は 10°C以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した麻しんワクチンおよびサポニンを 3 週間隔で 2 回マウスに接種し、血中の抗体産生をみた。試験成績から、麻しんワクチンのみを接種した場合に産生される ELISA 抗体価は 0.18 であったのに対し、サポニン添加ワクチンは、0.25 であった。

実施例 1 2. 風しんワクチン-オンジサポニン製剤 (点鼻剤) の調製

風しんワクチンと、PBS に溶解し濾過滅菌したオンジサポニン E を混合し、20 μL 中に風しんワクチン 20 μg 相当量のウイルス粒子と、オンジサポニン 2.5 μg を含むように調製した。これに安定剤 (0.1%グルタミン酸ナトリウム、5%乳糖) を加え、容器に分注して風しんワクチン-オンジサポニン点鼻剤とした。本品は 10°C以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した風しんワクチンおよびサポニンを 3 週間隔で 2 回マウス

に接種し、血中の抗体産生をみた。試験成績からワクチンのみを接種した場合に産生される ELISA 抗体価は 0.13 であったのに対し、サポニン添加ワクチンは、0.850 であった。

実施例 1 3 . おたふくかぜワクチン-オンジサポニン製剤 (点鼻剤) の調製

おたふくかぜワクチンと、PBS に溶解し濾過滅菌したオンジサポニン E を混合し、20 μ L 中におたふくかぜワクチン 20 μ g 相当量のウイルス粒子と、オンジサポニンを 2.5 μ g 含むように調製した。これに安定剤 (0.2%豚製ゼラチン、0.1%グルタミン酸ナトリウム、5%乳糖) を加え、容器に分注して、おたふくかぜワクチン-オンジサポニン点鼻剤とした。本品は 10°C 以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したおたふくかぜワクチンおよびサポニンを 3 週間隔で 2 回マウスに接種し、血中の抗体産生をみた。試験成績からワクチンのみを接種した場合に産生される ELISA 抗体価は 0.023 であったのに対し、サポニン添加ワクチンは、0.045 であった。

実施例 1 4 . 麻しん風しん混合ワクチン-オンジサポニン製剤 (点鼻剤) の調製

麻しん風しん混合ワクチンと、PBS に溶解し濾過滅菌したオンジサポニン E を混合し、20 μ L 中に各々のワクチン 7 μ g 相当量のウイルス粒子と、オンジサポニンを 2.5 μ g 含むように調製した。これに安定剤 (0.2%豚製ゼラチン、0.1%グルタミン酸ナトリウム、5%乳糖) を加え、容器に分注して、麻しん風しん混合ワクチン-オンジサポニン点鼻剤とした。本品は 10°C 以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した麻しん風しん混合ワクチンおよびサポニンを 3 週間隔で 2 回マウスに接種し、血中の抗体産生をみた。試験成績から、ワクチンのみを接種した場合に産生される ELISA 抗体価は麻しん、風しんのそれぞれは、0.14、0.090 であったのに対し、サポニン添加ワクチンは、各々 0.30、0.29 であった。

実施例 15. ロタワクチン-オンジサポニン製剤（経口、点鼻剤）の調製

ロタワクチンと、PBS に溶解し濾過滅菌したオンジサポニン E と F を含む画分を混合し、20 μ L 中にロタワクチン 3.3 μ g 相当量のウイルス粒子と、オンジサポニンを 10 μ g 含むように調製した。これを容器に分注して、ロタワクチン-オンジサポニン経口、点鼻剤とした。本品は 10°C 以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したロタワクチンおよびサポニンを 3 週間隔で 2 回マウスに接種し、血中の抗体産生をみた。試験成績から、ワクチンのみを接種した場合に産生される ELISA 抗体価は、点鼻接種の場合、0.089 であったのに対し、サポニン添加ワクチンは、0.38 であり、また、経口接種の場合、0.018 であったのに対し、サポニン添加ワクチンは、0.27 であった。

実施例 16. マイコプラズマワクチン-オンジサポニン製剤（注射剤）の調製

マイコプラズマワクチンと、PBS に溶解し濾過滅菌したオンジサポニン E と F を含む画分を混合し、1 mL 中にマイコプラズマワクチン 2.0×10^{10} CFU（コロニー形成単位）相当量のウイルス粒子と、オンジサポニンを 10 μ g 含むように調製した。これを容器に分注して、マイコプラズマワクチン-オンジサポニン注射剤とした。本品は 10°C 以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したマイコプラズマワクチンおよびサポニンを 2 週間隔で 3 回マウスに接種し、マイコプラズマ感染攻撃後病変をみた。試験成績から、ワクチンのみを接種されたマウスは 10 匹すべてに病変が認められたのに対し、サポニンを添加したものでは 10 匹当たり 3 匹のみに病変が認められた。病変数の平均値では、ワクチンのみでは 277 であったのに対し、サポニン添加ワクチンでは 142 であった。

実施例 17. インフルエンザ HA ワクチンに対する低用量オンジサポニンの二次抗体産生増強作用

実施例 3 と同様の方法で精製インフルエンザウイルス (A/北京/262/95 株) から調製したインフルエンザ HA ワクチン (0.1 mg/mL) と試料の生理食塩水溶液 (0.1 mg/mL) を等量混合し、接種材料を調製した。雌性、7 週齢の BALB/c マウスにアモバルビタールナトリウムを腹腔内投与して麻酔した。接種材料 20 μ L をマウスに経鼻接種した。マウスを 3 週間飼育後、ワクチンと試料の混合液をさらに二次経鼻接種した。さらに 1 週間飼育後、血清および鼻腔洗液を調製した。血清中の抗インフルエンザウイルス抗体価は HI 抗体価により測定した。鼻腔洗液は、放血後のマウスの左右の鼻腔より 1 mL の 0.1% BSA を含む PBS を 2 回ずつ灌流することによって回収した。鼻腔洗浄液中の抗 HA-IgA および抗 HA-IgG 量は ELISA によって測定した。

図 7 はオンジサポニン F の二次応答による血清中の抗インフルエンザウイルス抗体産生に対する影響を示したものである。オンジサポニン F はマウス 1 匹当たり 1 μ g の用量で血清中の HI 抗体価を HA ワクチン単独の場合よりも有意に上昇させた。また、オンジサポニン F のアジュバント活性は陽性対照として用いた同用量の CTB より若干弱い程度であった。

図 8 はオンジサポニン F の二次応答による鼻腔洗液中の抗インフルエンザウイルス IgA および IgG 抗体産生に対する影響を示したものである。ワクチンのみを鼻腔内接種したときには、低いレベルの抗 HA-IgA および IgG 抗体しか検出されなかった。これに対し、オンジサポニン F とワクチンを接種したグループではマウス 1 匹当たり 1 μ g の用量で鼻腔洗液中の抗 HA-IgA および IgG 抗体価を有意に上昇させた。オンジサポニン F の抗 HA-IgA 抗体価を上昇させるアジュバント活性は同用量の CTB よりも低かったが、CTB が抗 HA-IgG 抗体価を上昇させるアジュバント活性を全く示さなかったのに対し、オンジサポニン F は有意な活性を示した。

これらの結果は、アジュバントとして用いられたオンジサポニン F が、低用量においても血清中および鼻腔中で抗体産生を強く誘導する作用があることを示している。

産業上の利用の可能性

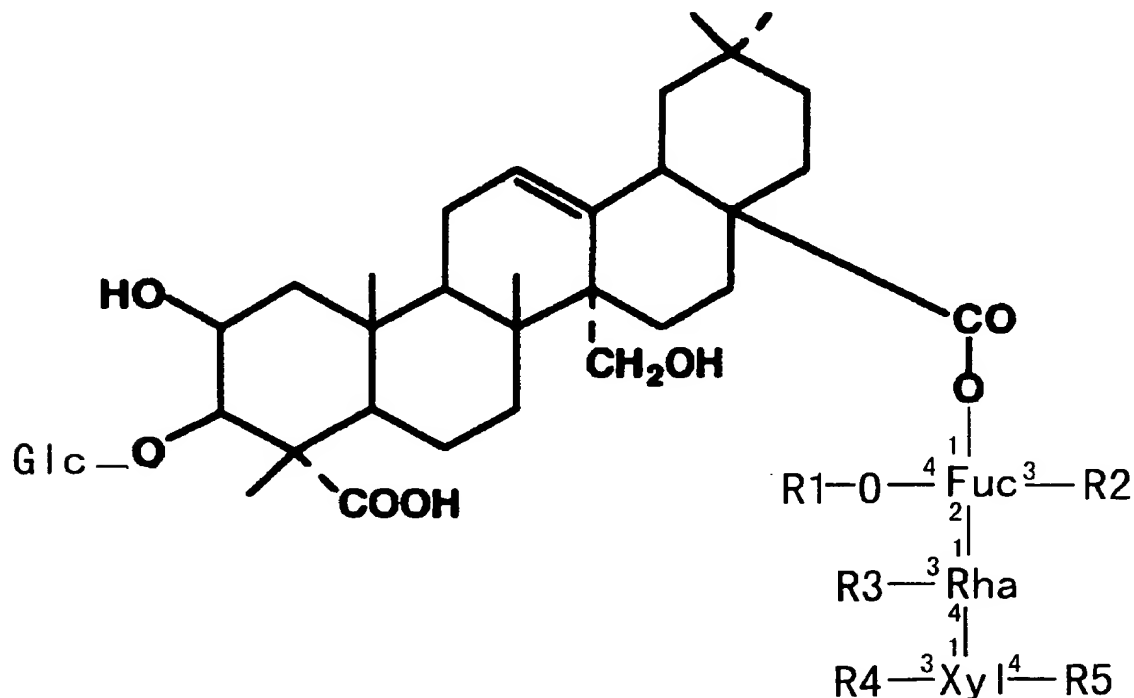
以上の実施例により次のことが明らかである。

1. オンジサポニンで構成される本発明のアジュバントは、共存するインフルエンザ HA ワクチンおよび百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンに対する抗体産生を増強する。
2. ワクチン抗原を本発明によるアジュバントとともに鼻腔ルートで接種すると、血中の抗体産生と共に局所（鼻腔洗浄液）の抗体産生も増強される。換言すれば本発明のアジュバントを使用することによって、ワクチン抗原の接種量を減少させることができ、副反応の軽減につながる。
3. オンジサポニンを含む本発明のアジュバントは、血中及び局所（鼻腔洗浄液）で、キラヤ・サポナリアの樹皮由来のサポニン混合物キル A よりも高い抗体産生増強活性を示すことから、キル A よりも強力なアジュバントである。
4. 本発明のアジュバントは、たとえばオンジサポニン E および F の様に、溶血活性を実質的に検出できない成分を含む。本発明の実施例によって明らかにされたとおり、一般に溶血活性が強いとされているサポニンではあるが、特定の化合物にあつては溶血活性を示さない。溶血活性を持たないサポニンが、他のサポニンから分離可能であり、しかもアジュバント活性を併せ持っていることを示した点において、本発明の成果は大きい。

以上に説明したように、本発明によるアジュバントを含むワクチン製剤は、ウイルスおよび細菌感染の予防あるいは治療に有効で、しかも安全性に優れた薬剤として期待される。

請求の範囲

1. プレセネゲニン骨格を母核とし、その 28 位が糖残基または置換糖残基によって置換されているサポニンを含むアジュバント、ただし前記置換糖残基が 4 置換の場合はアピオース残基を必須の置換基として含む。
2. 前記サポニンの 28 位に直接結合する糖残基または置換糖残基が、炭素数 3 以上の糖残基である請求項 1 に記載のアジュバント。
3. 前記サポニンの 28 位に直接結合する糖残基または置換糖残基が、フコース残基またはその置換体である請求項 2 に記載のアジュバント。
4. サポニンが下記の構造で示される化合物である請求項 3 に記載のアジュバント。



式中、Glc はグルコース残基を、Fuc はフコース残基を、Rha はラムノース残基を、Xyl はキシロース残基を表し、

R1 は、モノメトキシ桂皮酸残基、またはトリメトキシ桂皮酸残基を、

R2 は、H またはラムノース残基を、

R3 は、H またはアピオース残基を、

R4 は、H またはアラビノース残基を、そして

R5 は、H またはガラクトース残基を示す。

5. サポニンが、以下の群から選択される化合物の少なくとも1種を含むものである請求項4に記載のアジュバント。

R1 がモノメトキシ桂皮酸残基、R2 がラムノース残基、R3 がアピオース残基、R4 がH、そしてR5 がガラクトース残基である化合物、

R1 がトリメトキシ桂皮酸残基、R2、R3、R4 がH、そしてR5 がガラクトース残基である化合物、

R1 がトリメトキシ桂皮酸残基、R2 がH、R3 がアピオース残基、R4 がアラビノース残基、そしてR5 がHである化合物、

および、R1 がトリメトキシ桂皮酸残基、R2 がH、R3 がアピオース残基、そしてR4 とR5 がHである化合物。

6. 前記サポニンが生薬より調製したサポニンである請求項1～5のいずれかに記載のアジュバント。

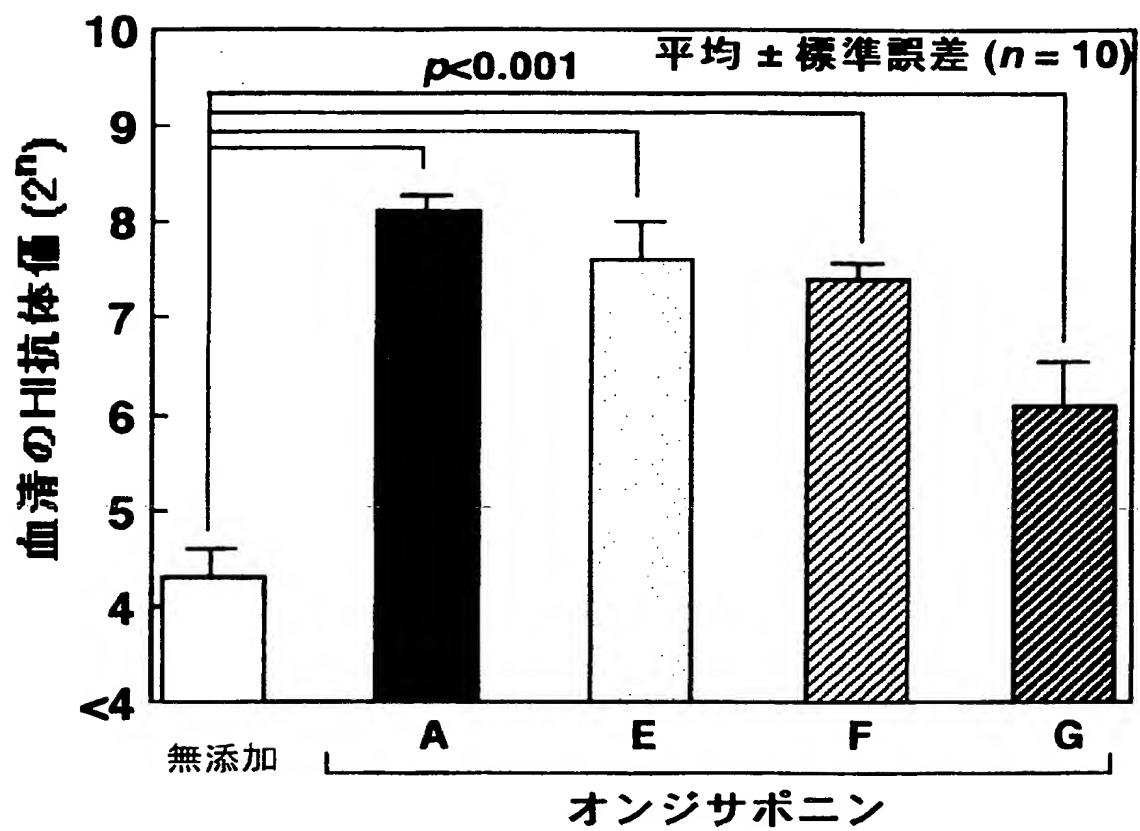
7. 請求項1～6のいずれかに記載のアジュバントを含むワクチン製剤。

8. 経鼻接種、または経口接種のためのものである請求項7に記載のワクチン製剤。

9. 免疫抗原成分として、インフルエンザウイルス、ロタウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、おたふくかぜウイルス、エイズウイルス、百日せき菌、ジフテリア菌、ヘリコバクター・ピロリ菌、出血性大腸菌(EHEC)、クラミジア原虫、マイコプラズマ原虫、マラリア原虫、コクシジウム原虫、および住血吸虫で構成される群から選択される単一または複数の病原微生物の抗原を含む請求項8に記載のワクチン製剤。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

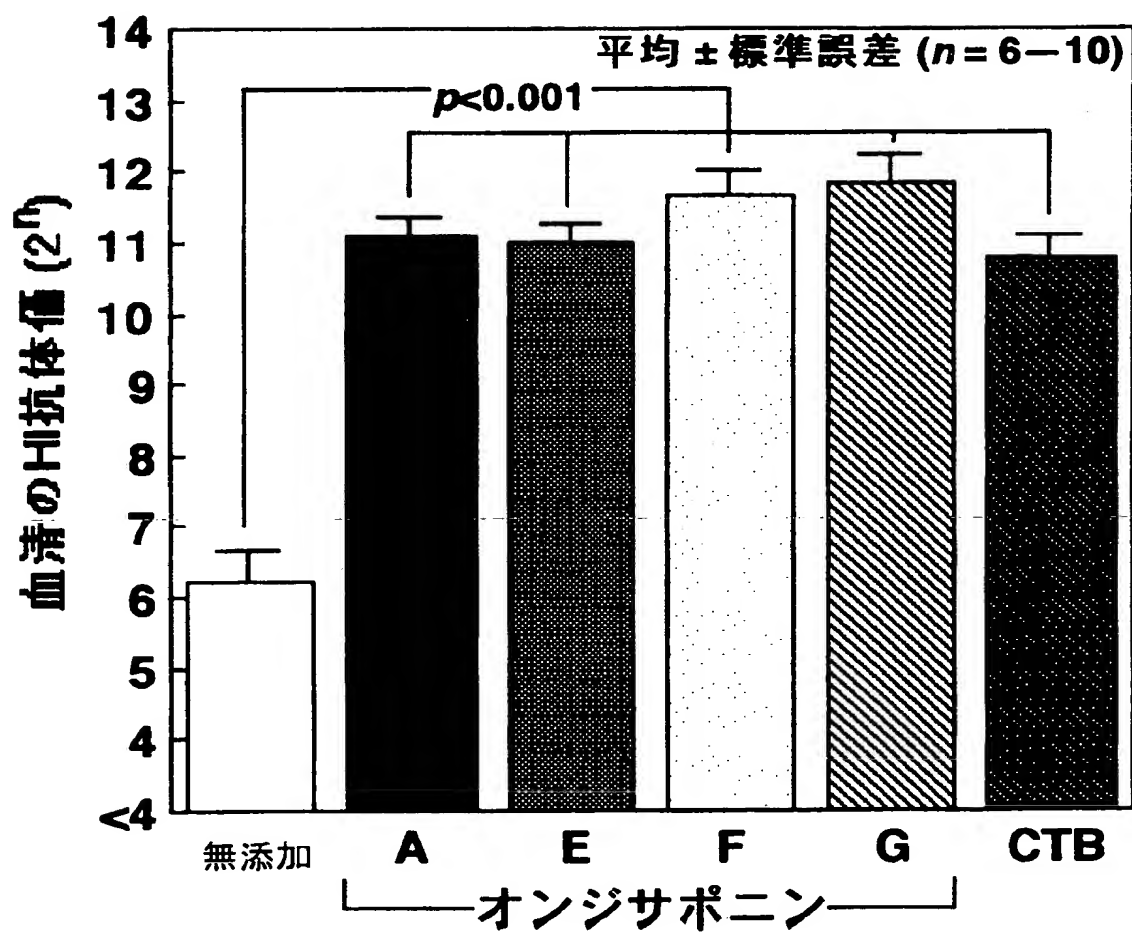
図 1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

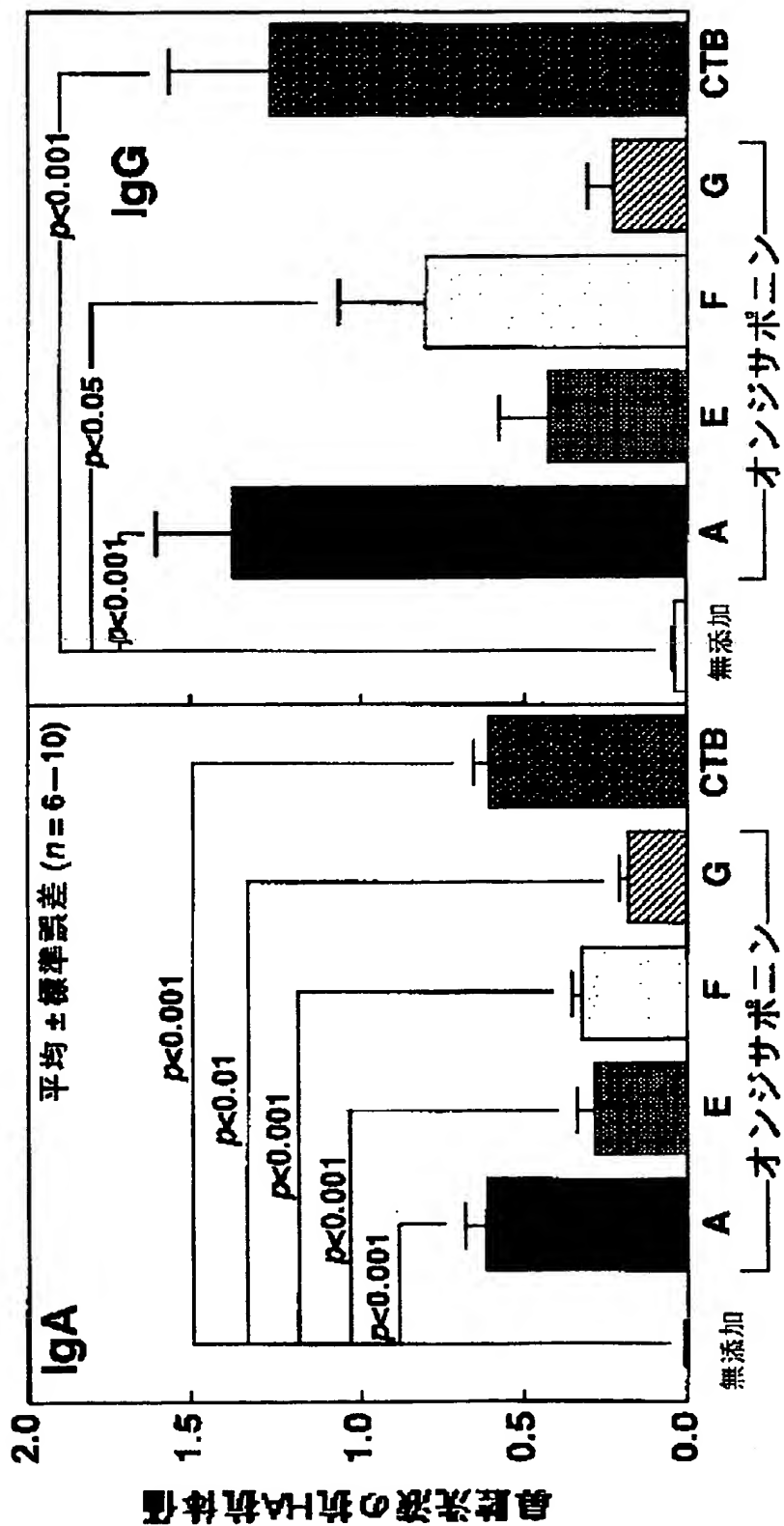
2 / 8

図 2



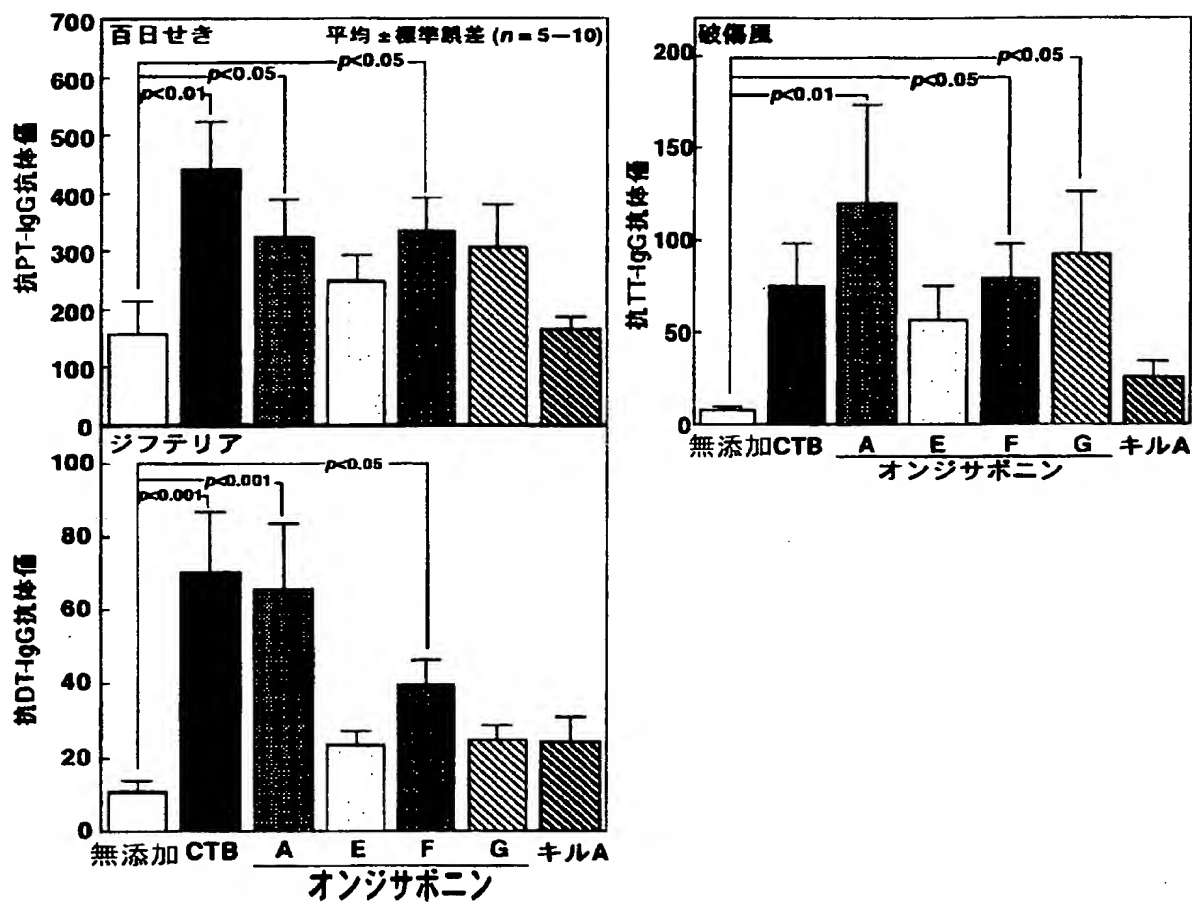
THIS PAGE BLANK (ISPTO)

図 3



THIS PAGE RI ANIK (ISPTO)

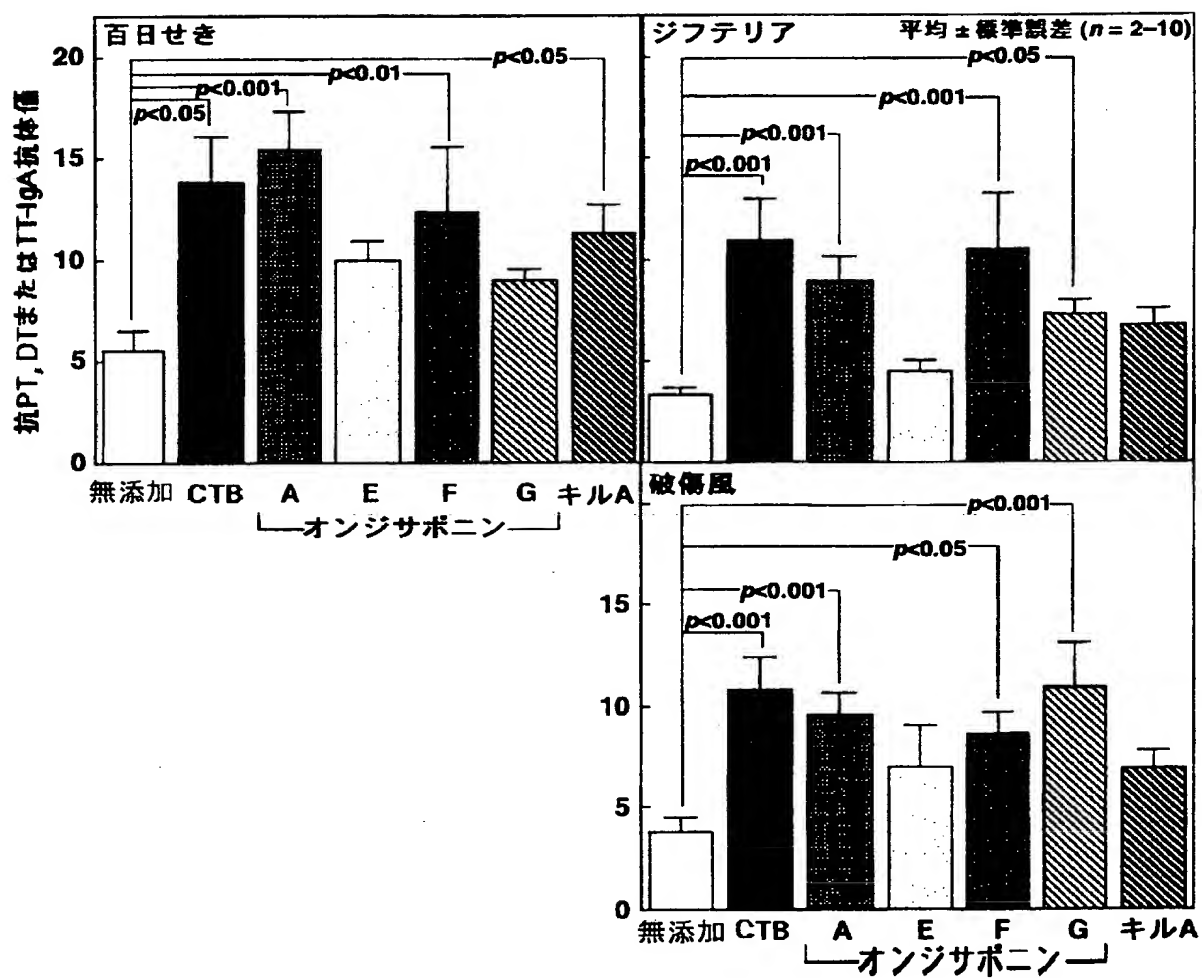
図 4



THIS PAGE BLANK (USPTO)

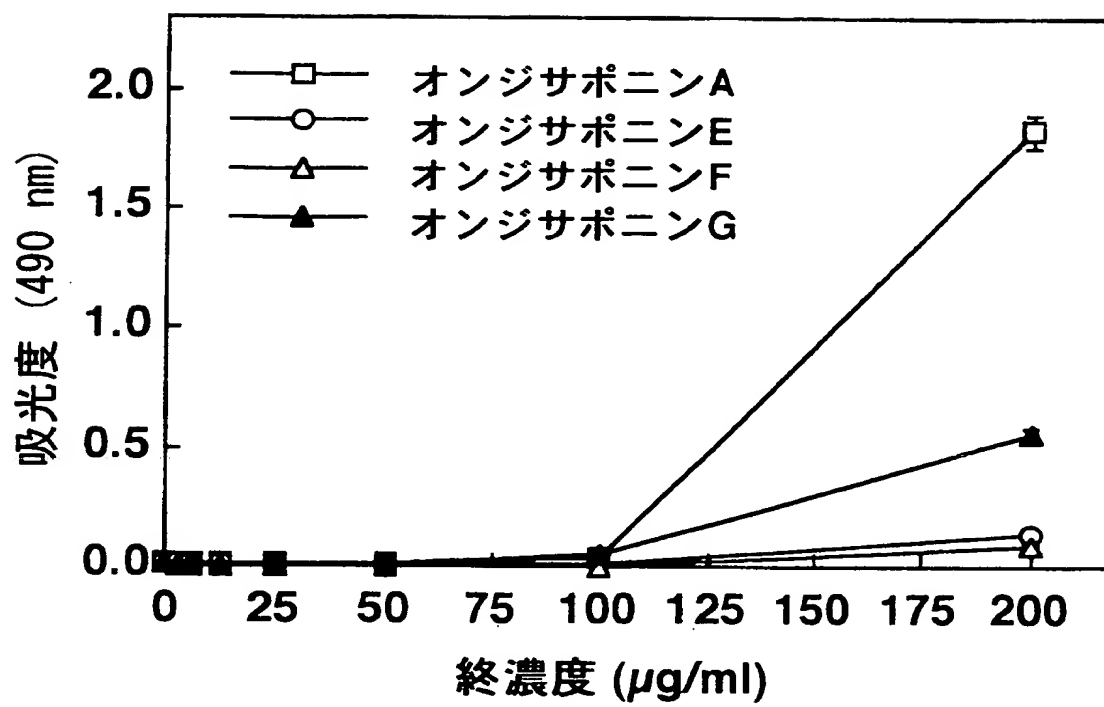
5 / 8

図 5



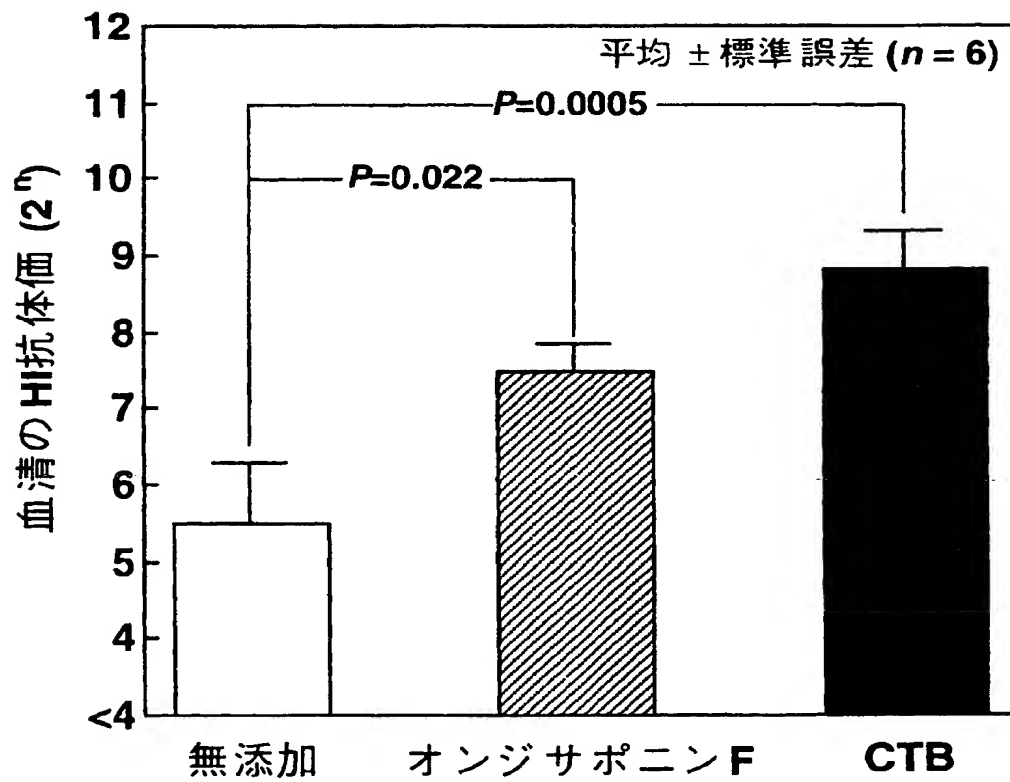
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 6



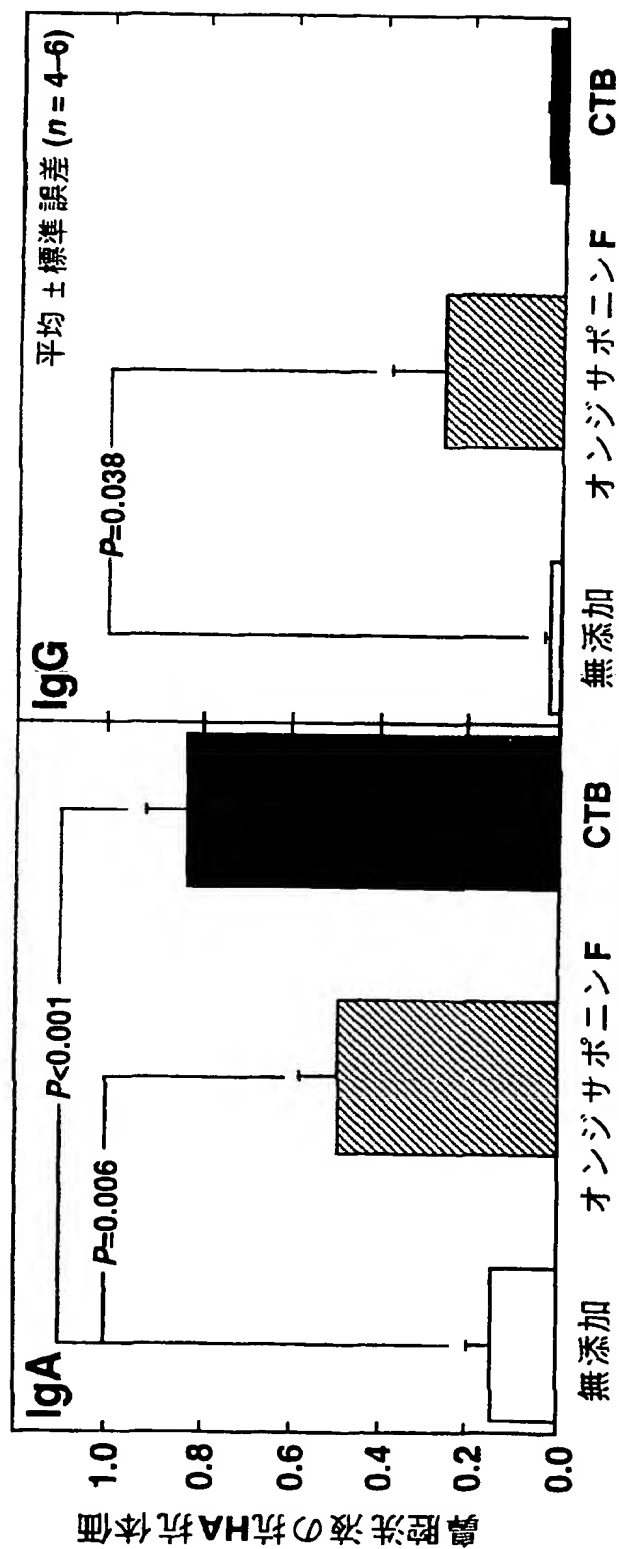
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 7



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 8



THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05019

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ A61K 39/39

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ A61K 39/00 - 39/39

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA, CAPLUS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Mita, A., Enhancement and suppression in production of	1, 2, 6
Y	IgM-antibody in mice treated with purified saponins., Biomedicine, 1979, Vol.31, No.8, pages 223-227, ISSN: 0300-0893	3-5, 7-9
Y	WO, 93/05789, A (Cambridge Biotech Corporation), 01 April, 1993 (01.04.93), & JP, 7-504156, A & US, 5057540, A & US, 5583112, A	3-5, 7-9
PX	WO, 99/07395, A (University of Saskatchewan), 18 February, 1999 (18.02.99)	1-3, 6-9
A	WO, 96/32401, A (LG Chemical, Ltd.), 17 October, 1996 (17.10.96), & JP, 9-510740, A & US, 5817314, A	1-9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
01 December, 1999 (01.12.99)

Date of mailing of the international search report
21 December, 1999 (21.12.99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/05019

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ A61K 39/39

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ A61K 39/00 - 39/39

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA, CAPLUS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Mita, A., Enhancement and suppression in production of IgM-antibody in mice treated with purified saponins., Biomedicine, 1979, Vol.31, No.8, pages 223-227,	1、2、6 3-5、7-9
Y	WO 93/05789 A (Cambridge Biotech Corporation) 1 April 1993 (01.04.93) & JP 7-504156 A & US 5057540 A & US 5583112 A	3-5、7-9
P X	WO 99/07395 A (University of Saskatchewan) 18 February 1999 (18.02.99)	1-3、6-9
A	WO 96/32401 A (LG Chemical, Ltd.) 17 October 1996 (17.10.96) & JP 9-510740 A & US 5817314 A	1-9

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01.12.99

国際調査報告の発送日

21 December 1999 (21.12.99)

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大宅 郁治



4C

8829

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 18 April 2000 (18.04.00)	Applicant's or agent's file reference K4-001PCT
International application No. PCT/JP99/05019	Priority date (day/month/year) 14 September 1998 (14.09.98)
International filing date (day/month/year) 14 September 1999 (14.09.99)	
Applicant YAMADA, Haruki et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
30 March 2000 (30.03.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer</p> <p>Maria Kirchner</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
--	---

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference K4-001PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/05019	International filing date (day/month/year) 14 September 1999 (14.09.99)	Priority date (day/month/year) 14 September 1998 (14.09.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 39/39		
Applicant THE KITASATO INSTITUTE		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.
- ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
- These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☒ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 30 March 2000 (30.03.00)	Date of completion of this report 14 November 2000 (14.11.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/05019

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/05019

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	3-5,7-9	YES
	Claims	1,2,6	NO
Inventive step (IS)	Claims	4,5	YES
	Claims	1-3,6-9	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-9	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: Mita, A., Enhancement and suppression in production of IgM-antibody in mice treated with purified saponins, Biomedicine, 1979, Vol. 31, No. 8, pages 223-227

Document 2: WO, 93-5789, A (Cambridge Biotech Corp.), 1 April, 1993 (01.04.93)

Explanation**Claims 1, 2 and 6**

Document 1 describes that senegin-III and -IV, which are saponins having a presenegenin skeleton and substituted by a 5- or 6-substituted sugar residue at the 28-position, thereof have adjuvant activity.

Claims 3 and 7-9

Since document 2 describes that saponins have adjuvant activity, it is not considered to require any particular inventiveness of a person skilled in the art, to conceive that a material having the presenegenin skeleton, a typical structure of saponins, has adjuvant activity.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/05019

VI. Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

<u>Application No. Patent No.</u>	<u>Publication date (day/month/year)</u>	<u>Filing date (day/month/year)</u>	<u>Priority date (valid claim) (day/month/year)</u>
WO99/07395 A [PX]	18 February 1999 (18.02.1999)	07 August 1998 (07.08.1998)	

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

<u>Kind of non-written disclosure</u>	<u>Date of non-written disclosure (day/month/year)</u>	<u>Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)</u>

THIS PAGE BLANK (USPTO)

特 許 協 力 条 約


P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 K4-001PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/05019	国際出願日 (日.月.年) 14.09.99	優先日 (日.月.年) 14.09.98
国際特許分類 (IPC) Int. Cl ⁷ A61K 39/39		
出願人 (氏名又は名称) 社団法人 北里研究所		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
 - ☒ 国際予備審査報告の基礎
 - ☐ 優先権
 - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
 - ☐ 発明の単一性の欠如
 - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - ☒ ある種の引用文献
 - ☐ 国際出願の不備
 - ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 30.03.00	国際予備審査報告を作成した日 14.11.00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 大宅 郁治 電話番号 03-3581-1101 内線 3452	4C 8829 

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1998年7月)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- | | | | |
|-------------------------------------|---------|--------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ | ページ、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ | 項、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ | 項、 | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ | 項、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ | 項、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ | ページ/図、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、 | 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)

請求の範囲	3～5、7～9	有
請求の範囲	1、2、6	無

進歩性 (IS)

請求の範囲	4、5	有
請求の範囲	1～3、6～9	無

産業上の利用可能性 (IA)

請求の範囲	1～9	有
請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献:

文献1: Mita, A., Enhancement and suppression in production of IgM-antibody in mice treated with purified saponins., Biomedicine, 1979, Vol.31, No.8, pages 223-227,

文献2: WO 93/05789 A (Cambridge Biotech Corporation) 1 April 1993 (01.04.93)

説明

請求の範囲 1, 2, 6

文献1には、プレセネゲニン骨格を有し、その28位が5又は6置換の糖残基により置換されているサポニンである senegin-III及び-IVがアジュバント活性を有することが記載されている。

請求の範囲 3, 7～9

文献2には、サポニンがアジュバント活性を有することが記載されていることから、サポニンの代表的な構造であるプレセネゲニン骨格を有する物資がアジュバント活性を有することに想到することは、当業者で有れば格別の創意を要することとは認められない。

THIS PAGE BLANK (USPTO,

VI. ある種の引用文献

1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
WO 99/07395 A 「PX」	18. 02. 99	07. 08. 98	

2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)
-----------------	------------------------------	--

THIS PAGE BLANK (USP)

特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

清水 初志

殿

あて名

〒 300-0847

茨城県土浦市御町1-1-1
関鉄つくばビル6階

PCT

国際予備審査報告の送付の通知書

（法施行規則第57条）

〔PCT規則71.1〕

発送日
（日.月.年）

05.12.00

出願人又は代理人
の書類記号

K4-001PCT

重要な通知

国際出願番号

PCT/J P 99/05019

国際出願日

（日.月.年） 14. 09. 99

優先日

（日.月.年） 14. 09. 98

出願人（氏名又は名称）

社団法人 北里研究所

1. 国際予備審査機関は、この国際出願に関して国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、それらをこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

2. 国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、すべての選択官庁に通知するために、それらの写しを国際事務局に送付する。

3. 選択官庁から要求があったときは、国際事務局は国際予備審査報告（付属書類を除く）の英語の翻訳文を作成し、それをその選択官庁に送付する。

4. 注 意

出願人は、各選択官庁に対し優先日から30月以内に（官庁によってはもっと遅く）所定の手続（翻訳文の提出及び国内手数料の支払い）をしなければならない（PCT39条（1））（様式PCT/IB/301とともに国際事務局から送付された注を参照）。

国際出願の翻訳文が選択官庁に提出された場合には、その翻訳文は、国際予備審査報告の付属書類の翻訳文を含まなければならない。

この翻訳文を作成し、関係する選択官庁に直接送付するのは出願人の責任である。

選択官庁が適用する期間及び要件の詳細については、PCT出願人の手引き第Ⅱ巻を参照すること。

名称及びあて名

日本国特許庁（IPEA/J P）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特 許 庁 長 官

4 C

8 8 2 9

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

様式PCT/IPEA/416（1992年7月）

（添付用紙の注意書きを参照）

THIS PAGE BLANK (USPTO)

特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁（国際調査機関）

出願人代理人

清水 初志

あて名

〒 300-0847

茨城県土浦市卸町1-1-1
関鉄つくばビル6階



殿

PCT

国際調査報告又は国際調査報告を作成しない旨
の決定の送付の通知書

(法施行規則第41条)
〔PCT規則44.1〕

発送日

(日.月.年)

21.12.99

出願人又は代理人
の書類記号

K4-001PCT

今後の手続きについては、下記1及び4を参照。

国際出願番号

PCT/JP99/05019

国際出願日

(日.月.年)

14.09.99

出願人（氏名又は名称）

社団法人 北里研究所

1. ☒ 国際調査報告が作成されたこと、及びこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
PCT19条の規定に基づく補正書及び説明書の提出

出願人は、国際出願の請求の範囲を補正することができる（PCT規則46参照）。

いつ 補正書の提出期間は、通常国際調査報告の送付の日から2月である。

詳細については添付用紙の備考を参照すること。

どこへ 直接次の場所へ

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland
Facsimile No.: (41-22)740.14.35

詳細な手続については、添付用紙の備考を参照すること。

2. ☐ 国際調査報告が作成されないこと、及び法第8条第2項（PCT17条(2)(a)）の規定による国際調査報告を作成しない旨の決定をこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

3. ☐ 法施行規則第44条（PCT規則40.2）に規定する追加手数料の納付に対する異議の申立てに関して、出願人に下記の点を通知する。

☐ 異議の申立てと当該異議についての決定を、その異議の申し立てと当該異議についての決定の両方を指定官庁へ送付することを求める出願人の請求とともに、国際事務局へ送付した。

☐ 当該異議についての決定は、まだ行われていない。決定されしだい出願人に通知する。

4. 今後の手続： 出願人は次の点に注意すること。

優先日から18月経過後、国際出願は国際事務局によりすみやかに国際公開される。出願人が公開の延期を望むときは、国際出願又は優先権の主張の取下げの通知がPCT規則90の2.1及び90の2.3にそれぞれ規定されているように、国際公開の事務的な準備が完了する前に国際事務局に到達しなければならない。

出願人が優先日から30月まで（官庁によってはもっと遅く）国内段階の開始を延期することを望むときは、優先日から19月以内に、国際予備審査の請求書が提出されなければならない。

国際予備審査の請求書若しくは、後にする選択により優先日から19箇月以内に選択しなかった又は第II章に拘束されないため選択できなかったすべての指定官庁に対しては優先日から20月以内に、国内段階の開始のための所定手続を取らなければならない。

名称及びあて名

日本国特許庁（ISA/JP）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特許庁長官

4C

8829

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

THIS PAGE BLANK (USPTO)

P C T

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)
[PCT 18 条、PCT 規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 K4-001PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/05019	国際出願日 (日.月.年) 14.09.99	優先日 (日.月.年) 14.09.98
出願人 (氏名又は名称) 社団法人 北里研究所		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (PCT 18 条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

- a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
- b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 (PCT 規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
 第 1 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。 ☐ なし
☒ 出願人は図を示さなかった。
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ A61K 39/39

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ A61K 39/00 - 39/39

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA, CAPLUS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Mita, A., Enhancement and suppression in production of IgM-antibody in mice treated with purified saponins., Biomedicine, 1979, Vol.31, No.8, pages 223-227,	1、2、6 3-5、7-9
Y	WO 93/05789 A (Cambridge Biotech Corporation) 1 April 1993 (01.04.93) & JP 7-504156 A & US 5057540 A & US 5583112 A	3-5、7-9
P X	WO 99/07395 A (University of Saskatchewan) 18 February 1999 (18.02.99)	1-3、6-9
A	WO 96/32401 A (LG Chemical, Ltd.) 17 October 1996 (17.10.96) & JP 9-510740 A & US 5817314 A	1-9

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01.12.99

国際調査報告の発送日

21.12.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大宅 郁治

4C

8829

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

THIS PAGE BLANK (USPTO)

EP



PCT

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)
〔PCT 18 条、PCT 規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 K4-001PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/05019	国際出願日 (日.月.年) 14.09.99	優先日 (日.月.年) 14.09.98
出願人 (氏名又は名称) 社団法人 北里研究所		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (PCT 18 条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 (PCT 規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 1 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☒ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ A61K 39/39

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ A61K 39/00 - 39/39

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA, CAPLUS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Mita, A., Enhancement and suppression in production of IgM-antibody in mice treated with purified saponins., Biomedicine, 1979, Vol.31, No.8, pages 223-227,	1、2、6 3-5、7-9
Y	WO 93/05789 A (Cambridge Biotech Corporation) 1 April 1993 (01.04.93) & JP 7-504156 A & US 5057540 A & US 5583112 A	3-5、7-9
PX	WO 99/07395 A (University of Saskatchewan) 18 February 1999 (18.02.99)	1-3、6-9
A	WO 96/32401 A (LG Chemical, Ltd.) 17 October 1996 (17.10.96) & JP 9-510740 A & US 5817314 A	1-9

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01.12.99

国際調査報告の発送日

21.12.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大宅 郁治



4 C

8 8 2 9

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

THIS PAGE BLANK (USPTO

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 11 DEC 2000

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 K4-001PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P99/05019	国際出願日 (日.月.年) 14.09.99	優先日 (日.月.年) 14.09.98
国際特許分類 (IPC) Int. Cl ⁷ A61K 39/39		
出願人 (氏名又は名称) 社団法人 北里研究所		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。


☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。

(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)

この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

I ☒ 国際予備審査報告の基礎II ☐ 優先権III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成IV ☐ 発明の単一性の欠如V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明VI ☒ ある種の引用文献VII ☐ 国際出願の不備VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 30.03.00	国際予備審査報告を作成した日 14.11.00		
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員)	4C	8829
	大宅 郁治 	電話番号 03-3581-1101 内線 3452	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	3～5、7～9	有
	請求の範囲	1、2、6	無
進歩性 (IS)	請求の範囲	4、5	有
	請求の範囲	1～3、6～9	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1～9	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献:

文献1: Mita, A., Enhancement and suppression in production of IgM-antibody in mice treated with purified saponins., Biomedicine, 1979, Vol.31, No.8, pages 223-227,

文献2: WO 93/05789 A (Cambridge Biotech Corporation) 1 April 1993 (01.04.93)

説明

請求の範囲1, 2, 6

文献1には、プレセネゲニン骨格を有し、その28位が5又は6置換の糖残基により置換されているサポニンであるsenegin-III及び-IVがアジュバント活性を有することが記載されている。

請求の範囲3, 7～9

文献2には、サポニンがアジュバント活性を有することが記載されていることから、サポニンの代表的な構造であるプレセネゲニン骨格を有する物資がアジュバント活性を有することに想到することは、当業者で有れば格別の創意を要することとは認められない。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VI. ある種の引用文献

1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
WO 99/07395 A 「Px」	18. 02. 99	07. 08. 98	

2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)
-----------------	------------------------------	--

THIS PAGE BLANK (USPTO)